



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**

**Universidad del Perú. Decana de América**

Dirección General de Estudios de Posgrado

Facultad de Medicina Veterinaria

Unidad de Posgrado

**Respuesta superovulatoria y embrionaria en alpacas  
estimuladas con gonadotropina coriónica equina según  
el número de folículos emergentes por onda folicular**

**TESIS**

Para optar el Grado Académico de Magíster en Ciencia Animal  
con mención en Producción y Reproducción Animal

**AUTOR**

Alfredo POZO CURO

**ASESOR**

Mg. Wilfredo HUANCA LÓPEZ

Lima, Perú

2020



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

## Referencia bibliográfica

---

Pozo A. Respuesta superovulatoria y embrionaria en alpacas estimuladas con gonadotropina coriónica equina según el número de folículos emergentes por onda folicular [Tesis de maestría]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina Veterinaria, Unidad de Posgrado; 2020.

---

## Hoja de Metadatos complementarios

Código ORCID del autor	“ ” —
DNI o pasaporte del autor	28602513
Código ORCID del asesor	<a href="https://orcid.org/0000-0002-7601-0067">https://orcid.org/0000-0002-7601-0067</a>
DNI o pasaporte del asesor	10036341
Grupo de investigación	“ ” —
Agencia financiadora	<b>PAIS</b>
	Perú
	<b>NOMBRE Y SIGLAS DE LA AGENCIA FINANCIADORA</b>
	Universidad Nacional Mayor de San Marcos -UNMSM
	<b>NOMBRE DEL PROGRAMA FINANCIERO:</b>
	Proyecto “Caracterización de la emergencia y repetibilidad de la onda folicular y su efecto sobre la respuesta a la estimulación ovárica en alpacas ( <i>Vicugna pacos</i> )” – Código 160801081- VRIP - UNMSM
	<b>N° DE CONTRATO</b>
	R.R. N° 00838-R-16. 29-Feb-16
Ubicación geográfica donde se desarrolló la investigación	<b>LUGAR</b>
	Perú, Puno, Melgar, Chuquibambilla
	<b>COORDENADAS GEOGRAFICAS</b>
	14°43'59.988" Latitud sur; 70°40'59.987" Longitud oeste
Año o rangos de años en que se realizó la investigación	2016
Disciplinas OCDE	Ciencia veterinaria <a href="https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#4.03.01">https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#4.03.01</a> Ciencia animal, Ciencia de productos lácteos <a href="https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#4.02.01">https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#4.02.01</a>



**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**  
Universidad del Perú. Decana de América  
**Facultad de Medicina Veterinaria**  
UNIDAD DE POSGRADO



**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE  
MAGÍSTER EN CIENCIA ANIMAL CON MENCIÓN EN PRODUCCIÓN Y  
REPRODUCCIÓN ANIMAL**

En el auditorio de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, siendo las 12:00 horas del día miércoles 22 de enero del 2020, el Jurado de Tesis de Grado de Magíster, presidido por el PhD. Víctor Leyva Vallejos y conformado por los siguientes miembros docentes: Mg. Wilfredo Huanca López (Asesor), MSc. Joel Iván Pacheco Curie y Dr. Teodosio Huanca Mamani, se dio inicio a la sustentación oral y pública de la Tesis intitulada:

**“Respuesta superovulatoria y embrionaria en alpacas estimuladas con gonadotropina coriónica equina según el número de folículos emergentes por onda folicular”,**  
presentado por el Bachiller:

**ALFREDO POZO CURO**

Quien sustentó la Tesis para obtener el Grado Académico de Magíster en Ciencia Animal con mención en Producción y Reproducción y absolvió satisfactoriamente las preguntas y objeciones formuladas por el Jurado y practicada la votación obtuvo la calificación de: **BUENO, (15) QUINCE**

A continuación, el Jurado por intermedio de su Presidente recomendó a la Unidad de Posgrado de la Facultad de Medicina Veterinaria, proponga el otorgamiento del Grado Académico de Magíster en Ciencia Animal con mención en Producción y Reproducción Animal, al Bachiller en Medicina Veterinaria Alfredo Pozo Curo.

Siendo las 13:30 horas del día miércoles 22 de enero de 2020, se dio por concluido el acto académico, suscribiéndose la presente Acta.

.....  
Ph.D. Víctor Leyva Vallejos (P.P.D.E.)  
**Presidente**

.....  
Mg. Wilfredo Huanca López (P.P.D.E.)  
**Miembro (Asesor)**

.....  
Dr. Teodosio Huanca Mamani  
**Miembro Externo**

.....  
MSc. Joel Iván Pacheco Curie (P. Aux. T.C.)  
**Miembro**

.....  
Dr. César Miguel Gavidia Chucán (P.P.D.E.)  
**Director de la Unidad de Posgrado UNMSM**



## DEDICATORIA

A Dios, por brindarme la gran oportunidad  
de seguir desarrollándome profesionalmente.

A Víctor y Mercedes, mis padres,  
por su apoyo invaluable en aras de ser  
profesional y persona de bien ante la sociedad.

A Nila, mi querida esposa;  
a Víctor André Néel y Emny Princess, mis hijos,  
por sus incansables apoyos y comprensiones  
durante los años de estudios y la realización de la tesis,  
lejos de casa.

A Carlos, Alex, Rolando y Eberson,  
mis hermanos y grandes consejeros,  
que la vida me ha permitido gozar.

Alfredo

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Decana de América, por haberme acogido durante los estudios de post grado y permitirme ser miembro integrante de su vasta experiencia en las ciencias veterinarias.

Al Dr. Wilfredo Huanca López, maestro, amigo y asesor; por haberme permitido compartir sus experiencias, además, permitirme la realización del presente trabajo de investigación.

Al Dr. Juan Zaballos Aragón (Q.E.P.D.), exdirector del CIP “Chuquibambilla”, maestro y amigo; a los señores Aquiles (Q.E.P.D.), Clemente, Alejandro, Manolo, Eduardo, Evaristo, Casimiro, Ignacio, por brindarnos las facilidades y comodidades en el CIP “Chuquibambilla”, UNA-Puno durante la estancia de nuestro equipo investigador.

Al Dr. Luis Olivera, Decano de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNA-Puno, MV. Rassiel Macedo, Mg. Uri Harol Pérez, Mg. Hugo Deza, por su apoyo en el desarrollo del presente trabajo de investigación.

A Alvaro, Melissa, Gabriel, Nataly, Cecibel, Melanie, Nancy, Giovanny, Milagros, Paulo, Gabriela, Liz, Abiel, Martha, Gerald, Vitaliano, Renato, Josías, Jesús y Gloria, mis grandes amigos, por su inmensas e invaluable ayudas en la realización de este anhelo, hecho realidad.

## RESUMEN

El propósito fue evaluar la respuesta superovulatoria y colección embrionaria en alpacas estimuladas con gonadotropina coriónica equina (eCG) según el número de folículos emergentes  $\geq 3$  mm determinados en una previa onda folicular (OF). Se seleccionaron 26 alpacas de propiedad del CIP “Chuquibambilla”, UNA-Puno, conformando dos grupos experimentales (GEs) en función al número de folículos emergentes (GE01:  $\leq 3$  folículos,  $n = 15$ ; GE02:  $\geq 4$  folículos,  $n = 11$ ). Las alpacas fueron ecografiadas interdiariamente hasta inicios de la tercera OF. Posteriormente, alpacas con folículos  $\geq 7$  mm fueron inducidas a la ovulación con acetato de buserelina (día 0), se verificó la ovulación a las 36 h y se administró 700 UI de eCG. Al día 6.5 se hizo el empadre y 7.5 días después se colectaron los embriones (día 14). La data se procesó con SPSS v22.0 y con un nivel de significación de 5 % ( $p < 0.05$ ). El número de folículos  $\geq 7$  mm al día 7.5 ( $7.5 \pm 3.7$  y  $10.1 \pm 6.3$ ;  $p = 0.20$ ) y cuerpos lúteos al día 14 ( $7.2 \pm 3.3$  y  $8.6 \pm 5.0$ ;  $p = 0.23$ ), así como la cantidad de folículos luteinizados (GE01:  $1.6 \pm 0.5$ , GE02:  $2.8 \pm 1.3$ ;  $p = 0.13$ ) y folículos anovulatorios (GE01:  $2.0 \pm 1.0$ , GE02:  $2.0 \pm 2.2$ ;  $p = 0.35$ ) fueron similares en GE01 y GE02, respectivamente. Se colectaron embriones del 80 % (12/15) de alpacas del GE01 y del 70 % (7/10) del GE02, con un total de  $2.5 \pm 1.4$  y  $2.3 \pm 1.1$  embriones para el GE01 y GE02 ( $p = 0.73$ ), respectivamente. La cantidad de embriones de calidad excelente, bueno y malo fueron similares entre ambos GEs ( $p = 0.09$ ), excepto en la calidad regular. No hubo diferencias para el grado de desarrollo ( $p = 0.41$ ) y el número de embriones transferibles ( $p = 0.77$ ) entre GEs. Los resultados sugieren que no hay diferencia en la respuesta superovulatoria al día 7.5 y embrionaria al día 14 en función al mayor o menor número de folículos emergentes  $\geq 3$  mm en la primera onda folicular.

**Palabras clave:** alpaca, eCG, emergencia folicular, respuesta ovárica, superovulación



## ABSTRACT

The purpose was to evaluate the superovulatory response and embryonic collection in alpacas stimulated with equine chorionic gonadotropin (eCG) according to the number of emerging follicles  $\geq 3$  mm determined in a previous follicular wave (FW). 26 alpacas owned by CIP “Chuquibambilla”, UNA-Puno, were selected, forming two experimental groups (GEs) based on the number of emerging follicles (GE01:  $\leq 3$  follicles,  $n = 15$ ; GE02:  $\geq 4$  follicles,  $n = 11$ ). The alpacas were sonographed daily until the beginning of the third FW. Subsequently, alpacas with follicles  $\geq 7$  mm were induced to ovulate with buserelin acetate (day 0), ovulation was verified at 36 h and 700 IU of eCG was administered. On day 6.5, the embryo was made and 7.5 days later the embryos were collected (day 14). The data was processed with SPSS v22.0 and with a significance level of 5% ( $p < 0.05$ ). The number of follicles  $\geq 7$  mm ( $7.5 \pm 3.7$  and  $10.1 \pm 6.3$ ;  $p = 0.20$ ) on day 7.5 and luteal bodies on day 14 ( $7.2 \pm 3.3$  and  $8.6 \pm 5.0$ ;  $p = 0.23$ ), as well as the number of luteinized follicles (EG01:  $1.6 \pm 0.5$ , EG02:  $2.8 \pm 1.3$ ;  $p = 0.13$ ) and anovulatory follicles (EG01:  $2.0 \pm 1.0$ , EG02:  $2.0 \pm 2.2$ ;  $p = 0.35$ ) were similar in EG01 and EG02, respectively. Embryos of 80% (12/15) of alpacas from GE01 and 70% (7/10) from GE02 were collected, with a total of  $2.5 \pm 1.4$  and  $2.3 \pm 1.1$  embryos for GE01 and GE02 ( $p = 0.73$ ), respectively. The quantity of embryos of excellent, good and bad quality were similar between both GEs ( $p = 0.09$ ), except in the regular quality. There were no differences for the degree of development ( $p = 0.41$ ) and the number of transferable embryos ( $p = 0.77$ ) between GEs. The results suggest that there is no difference in the superovulatory response at day 7.5 and embryonic response at day 14 depending on the greater or lesser number of emerging follicles  $\geq 3$  mm in the first follicular wave.

**Key words:** alpaca, eCG, follicular emergence, ovarian response, superovulation

# CONTENIDO

<b>DEDICATORIA .....</b>	<b>3</b>
<b>AGRADECIMIENTOS .....</b>	<b>4</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>5</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>6</b>
<b>CONTENIDO .....</b>	<b>7</b>
<b>LISTA DE CUADROS .....</b>	<b>9</b>
<b>LISTA DE TABLAS .....</b>	<b>10</b>
<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>11</b>
<b>LISTA DE APÉNDICES .....</b>	<b>12</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>15</b>
<b>II. REVISIÓN DE LITERATURA.....</b>	<b>17</b>
2.1. Origen de los ovocitos .....	17
2.2. Foliculogénesis.....	18
2.3. Recuento de folículos antrales.....	22
2.4. Ondas foliculares .....	24
2.4.1. Ondas foliculares en rumiantes.....	24
2.4.2. Ondas foliculares en camélidos sudamericanos.....	25
2.6. Gonadotropina coriónica equina (eCG) .....	27
2.7. Superovulación y producción de embriones en camélidos sudamericanos.....	28
2.8. La ultrasonografía y su aplicación en los camélidos sudamericanos.....	34
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>36</b>
3.1. Ubicación .....	36
3.2. Animales .....	36
3.3. Procedimiento metodológico.....	37
3.3.1. Selección de animales .....	37
3.3.2. Superovulación .....	39
3.3.3. Colección embrionaria .....	39
3.3.4. Búsqueda y clasificación de embriones.....	40

3.4.	Análisis de datos.....	41
<b>IV.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>43</b>
4.1.	Respuesta superovulatoria con eCG en alpacas según el número de folículos emergentes en la onda folicular.....	43
4.2.	Producción embrionaria con eCG en alpacas según el número de folículos emergentes de la onda folicular .....	45
4.3.	Folículos emergentes en ondas foliculares consecutivas según grupos experimentales ...	47
<b>V.</b>	<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>49</b>
5.1.	Respuesta superovulatoria con eCG en alpacas según el número de folículos emergentes en la onda folicular.....	49
5.2.	Producción embrionaria con eCG en alpacas según el número de folículos emergentes en la onda folicular .....	53
5.3.	Folículos emergentes en ondas foliculares consecutivas según grupos experimentales ...	55
<b>VI.</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>59</b>
<b>VII.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>60</b>
<b>VIII.</b>	<b>APÉNDICES .....</b>	<b>76</b>

## LISTA DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 1. Respuesta ovárica a la superovulación con eCG en alpacas según grupos experimentales	44
Cuadro 2. Alpacas con colección embrionaria y promedio de embriones colectados, según grupo experimental en alpacas estimuladas con eCG	45
Cuadro 3. Alpacas superestimuladas con eCG según el número de embriones colectados y por grupo experimental	46
Cuadro 4. Calidad de embriones colectados en alpacas superestimuladas con eCG, según grupos experimentales	46
Cuadro 5. Colección de embriones transferibles y no transferibles en alpacas superestimuladas con eCG, según grupos experimentales	47
Cuadro 6. Grado de desarrollo de embriones colectados en alpacas superestimuladas de eCG, según grupo experimental	47
Cuadro 7. Número de folículos emergentes $\geq 3$ mm de diámetro durante tres ondas foliculares según grupo experimental	48

## LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1.	
Respuesta ovárica y embrionaria con eCG en alpacas	30
Tabla 2.	
Protocolos de estimulación ovárica en llamas con eCG	32
Tabla 3.	
Características e indicaciones de transductores con diferentes frecuencias usadas en teriogenología	35

## **LISTA DE FIGURAS**

	<b>Pág.</b>
Figura 1. Esquema de trabajo	38

## LISTA DE APÉNDICES

	Pág.
Anexo 1A	Ficha de recolección de datos para seguimiento de la onda folicular 77
Anexo 2A	Ficha de recolección de datos para el protocolo de superovulación con eCG 78
Anexo 3A	Prueba estadística de normalidad Shapiro-Wilk de las variables estudiadas 80
Anexo 4A	Prueba de hipótesis no paramétrica de Mann-Whitney para el tamaño del folículo inducido a la ovulación al día cero de la SO, número de folículos de 3 a 7 mm de diámetro al D 7.5; número total de embriones, tamaño de folículos luteinizados, número de folículos anovulatorios al día 14 en alpacas superestimuladas con eCG, según GEs. 81
Anexo 5A	Prueba de hipótesis paramétrica t de student para el número de folículos emergentes $\geq 3$ mm a las 36 h, número y tamaño de folículos $\geq 7$ mm de diámetro, número de cuerpos lúteos, número de folículos luteinizados y tamaño de folículos anovulatorios en alpacas superestimuladas con eCG, según GEs. 82
Anexo 6A	Prueba de hipótesis chi-cuadrado con corrección de continuidad para la comparación del número de alpacas superestimuladas con eCG con colección embrionaria, según GEs 84
Anexo 7A	Prueba exacta de fisher para la comparación del número de alpacas superestimuladas con eCG según el número de embriones colectados y por GE 85
Anexo 8A	Prueba exacta de Fisher para la comparación del número de embriones colectados según calidad entre los GEs 86

Anexo 9A	Prueba de hipótesis de chi-cuadrado con corrección de continuidad para la comparación de embriones transferibles y no transferibles entre GEs	87
Anexo 10A	Prueba exacta de Fisher y diferencia múltiple de proporciones para la recuperación de embriones según grado de desarrollo en alpacas súper estimuladas con eCG según GEs	88
Anexo 11A	Prueba de hipótesis no paramétrica de Mann-Whitney para el número de folículos emergentes $\geq 3$ mm de diámetro en tres ondas foliculares consecutivas según GEs	89
Figura 1A	Imágenes ultrasonográficas de emergencia folicular en alpacas suri (día 4) post-inducción de la ovulación con y sin folículos medibles $\geq 3$ mm de diámetro (A, B, C) y su representación esquemática (A', B', C')	90
Figura 2A	Respuesta ovárica superovulatoria en alpacas con eCG (A, B, C) y su representación esquemática (A', B', C')	91
Figura 3A	Imágenes de cuerpos lúteos al D 14 de iniciado el protocolo de superovulación con eCG (A, B) y su representación esquemática (A', B')	92
Figura 4A	Ovarios superestimulados con eCG con presencia de cuerpos lúteos compactos, luteinizados y anovulatorios (A, B, C) y sus representaciones esquemáticas (A', B' C'). Ovarios con quistes foliculares	93
Figura 5A	Número de folículos emergentes $\geq 3$ mm en la 1ra., 2da. y 3ra. onda folicular en alpacas según GEs	94
Figura 6A	Número de folículos de 3 a 7 mm al día 7.5 de iniciado el protocolo de superestimulación ovárica con eCG en alpacas, según GEs	94
Figura 7A	Número de folículos $\geq 7$ mm de diámetro como respuesta ovárica al tratamiento superovulatorio con eCG en alpacas, según GEs	95



Figura 8A      Número de cuerpos lúteos, folículos anovulatorios luteinizados y  
folículos anovulatorios al día 14 del protocolo superestimuladorio  
con eCG en alpacas, según GEs 95

## I. INTRODUCCIÓN

La alpaca constituye un recurso valioso para el poblador alto andino porque le provee carne, fibra de alta calidad, como medio de carga y transporte (Germana *et al.*, 2016) a pesar que su crianza se desarrolla en lugares donde la agricultura es cada vez más escasa por las condiciones bioclimáticas y en tierras con poca o nula rentabilidad (Charbonneau, 2009). Por tanto, la masificación de genes de alto valor económico y productivo en la alpaca ha favorecido a la introducción y desarrollo de las tecnologías reproductivas asistidas (TRA) como la ovulación múltiple, producción *in vivo* e *in vitro* de embriones y su transferencia.

Las investigaciones acerca de la ovulación múltiple y producción de embriones en alpacas usando diversos protocolos basados en la FSH y la eCG solas o combinadas son diversas. Dosis de 400 UI durante 3 días y por vía SC en presencia de un folículo < 7 mm (Novoa y Sumar, 1968), 650 UI en dosis única por vía IM durante el inicio de la onda folicular (Cervantes, 2008) o 1000 UI de eCG (Vivanco *et al.*, 2014b) producen diferencias en la respuesta ovárica según en número de folículos, cuerpos lúteos, incluso en la formación de folículos anovulatorios y luteinizados (Tibary *et al.*, 2015) con efecto directo sobre la

recuperación embrionaria. Dicha variabilidad puede ser asociada a diversos factores intrafoliculares y extra ováricos (Webb & Campbell, 2007), sugiriendo deficiencias para la implementación de la técnica.

En reproducción animal, la aplicación de la ecografía como método poco invasivo ha permitido comprender en tiempo real, procesos y eventos poco conocidos. Por ello, el inicio de la onda folicular en la alpaca, en condiciones de manejo diferentes al de los andes peruanos, fue descrita por la aparición de 8 a 10 folículos con diámetros  $< 3$  mm, seguido de la progresión comúnmente de uno, a veces dos o tres folículos de 3-5 mm de tamaño, los cuales siguen creciendo o mantienen su tamaño durante los primeros ocho días después de la emergencia (Vaughan *et al.*, 2004). Estudios en el Perú, reportan el inicio de la onda folicular en alpacas mediante el crecimiento de folículos emergentes  $\geq 4$  mm en  $4.3 \pm 1.4$  días en promedio (Andrade, 2007) o de  $2.8 \pm 1.3$  folículos emergentes  $\geq 3$  mm (rango de 1-8) y repetible en ondas foliculares sucesivas ( $r = 0.72$ ) (Vásquez, 2018).

El recuento de folículos antrales (RFA) en bovinos ha tomado mucha importancia en los últimos tiempos. Se han cuantificado ecográficamente los folículos antrales  $\geq 3$  mm con una amplia variabilidad entre animales (5 a 50 folículos) y con alta repetibilidad ( $r = 0.89$ ) en ondas foliculares sucesivas (Ireland *et al.*, 2007; Evans *et al.*, 2011). El RFA podría contribuir a la selección fenotípica de vacas con mayor o menor número de folículos, porque está asociado con la mayor o menor reserva ovárica, la fertilidad, concentraciones hormonales (progesterona y hormona antimülleriana) y espesor endometrial. Por lo tanto, la respuesta a la súper estimulación ovárica pudo predecirse ecográficamente por el número de folículos  $\geq 2$  mm a la aparición de las ondas foliculares en vacas (Singh *et al.*, 2004).

En camélidos sudamericanos existe limitada información sobre el efecto de tratamientos superovulatorios en camélidos sudamericanos en función al número de folículos emergentes. En este contexto, el presente estudio tuvo la finalidad de evaluar la respuesta súper ovulatoria y producción embrionaria usando 700 UI de gonadotropina coriónica equina (eCG) según el número de folículos emergentes en la onda folicular en alpacas de la raza suri en condiciones del altiplano peruano.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1. Origen de los ovocitos

Los ovocitos se originan mediante la sucesión de eventos que inician desde la formación de las ovogonias hasta la constitución de los ovocitos II. Las ovogonias derivan las Células Germinales Primordiales (CGPs) procedentes del epiblasto (mesodermo extraembrionario), quienes migran a las gónadas primitivas del mesonefro durante el desarrollo embrionario (Gigli *et al.*, 2006). En mamíferos, el tiempo de arribo de las CGPs al ovario primitivo es variable. En humanos ocurre a partir del día 28 de la gestación (Witschi, 1948), día 35 en vacas (Erickson, 1966), día 18 en porcinos (Black & Erickson, 1968), día 10.5 en ratón (Monk & McLaren, 1981), día 22 en yeguas (Curran *et al.*, 1997), día 25 en cabras (Lee *et al.*, 1998) y ovejas al día 23 (Juengel *et al.*, 2002). Las CGPs una vez establecidas en las gónadas, entran en la mitosis con citoquinesis incompleta para formar nidos o quistes de células germinales que consisten en ovogonias conectadas entre sí por puentes intercelulares (Tingen *et al.*, 2009) y a su vez, estos grupos de células son encerrados por cordones ovígeros constituidos por células epiteliales pregranulosas (Mazaud *et al.*, 2005). Las células pregranulosas pueden provenir de la *rete ovarii*, células mesenquimales de la gónada o el

epitelio de la superficie del ovario, cuya fuente o fuentes variarán según la especie (Sawyer *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2010). El inicio del proceso meiótico en la mayoría de estos ovocitos ocurre en la vida embrionaria (Bahr, 2018) y garantiza que las ovogonias se transformen en ovocitos (Gigli *et al.*, 2006).

## **2.2. Foliculogénesis**

La foliculogénesis es el proceso de formación, crecimiento y diferenciación de los folículos ováricos, que abarca desde la conformación de los folículos primordiales hasta el desarrollo del folículo preovulatorio (Gigli *et al.*, 2006). La formación de los folículos es un proceso regulado por la acción de varios genes, factores de transcripción y hormonas (Barh, 2018). La formación de los folículos es una sucesión de eventos intrincado y de duración prolongada, que involucra la multiplicación y la diferenciación regulada bajo una comunicación mutua entre las células somáticas y células germinales (Webb y Campbell, 2007). Por lo tanto, el folículo por lo general, está constituido por un ovocito de posición central rodeado por las células de la granulosa (Ihm, 2009).

Los folículos se clasifican en primordiales, primarios, secundarios y terciarios de acuerdo con las características histológicas de las células de la granulosa que rodean al ovocito y al grado de maduración que este adquiere (Gigli *et al.*, 2006). Los folículos primordiales se forman tras la descomposición del nido de células germinales, con pérdida de un gran número de ovocitos, necesario como parte del proceso selectivo de control de calidad, con la posterior invasión de células pre-granulosas escamosas a los sincitios de las células germinales u ovocitos sobrevivientes, conformando los folículos primordiales (Tingen *et al.*, 2009). Aquellos ovocitos que no logran rodearse de células pre-granulosas, probablemente sufran la muerte celular programada (Adams *et al.*, 2008; Smitz y Corvindr, 2002). Se ha evidenciado que la foliculogénesis en los mamíferos se inicia en la región más interna de la corteza del ovario (Barh, 2018).

El establecimiento de los folículos primordiales, constituyen la única fuente gametogénica que la hembra tendrá a su disposición una vez iniciada su vida reproductiva (Gigli *et al.*, 2006). Sin embargo, la mayor parte de este almacén de ovocitos (99,9 %) se pierden por apoptosis y solo unos pocos son activados por mecanismos aún poco comprendidos para crecer y desarrollarse en folículo primario, secundario y antral (Webb *et*

*al.*, 2016). El ovocito durante su crecimiento experimenta el incremento de organelos citoplasmáticos como retículos endoplásmicos, complejos de Golgi y mitocondrias (Peters & McNatty, 1980). Las mitocondrias son abundantes durante la foliculogénesis y ovogénesis, regulan la homeostasis de calcio, proveen grandes cantidades de energía y con ello consumen cerca del 85 % del oxígeno celular, produciendo grandes cantidades de especies reactivas de oxígeno, que si no se regulan mediante mecanismos de equilibrio redox mitocondriales adecuados, dañarían el ADN, oxidarían proteínas y lípidos, además, liberarían citocromo B, favoreciéndose la apoptosis celular (Ott *et al.*, 2007; Ramalho-Santos *et al.*, 2009).

El inicio del crecimiento folicular puede ocurrir en un periodo de tiempo muy variable que van desde días hasta años posteriores a la aparición de los folículos (Lunardelli *et al.*, 2013). Los folículos primarios y secundarios son también conocidos como folículos preantrales. Los primeros se caracterizan porque los ovocitos I, se rodean de una capa de células cúbicas y se forma la zona pelúcida de naturaleza glicoproteica (Gigli *et al.*, 2006). El cambio morfológico de las células de la granulosa y el incremento del diámetro del ovocito indican la activación del folículo (Aerts y Bols, 2010). Los segundos difieren de los primeros por la presencia de más estratos de células de la granulosa que circundan al ovocito I, además las células de la teca interna se diferencia en una capa interna y externa. Los folículos terciarios o antrales contienen una cavidad con licor folicular que va en incremento producto del trasudado de las células cúbicas de la granulosa dispuestas en capas, generando un reordenamiento de estas en células del cúmulo y células murales, además, la teca interna se conforma de tejido conectivo y la teca externa contiene colágeno atravesada por capilares sanguíneos y miofibroblastos. De otro lado, las células de la granulosa, a nivel de la membrana celular, logran mayor desarrollo de receptores para la hormona folículo estimulante (FSH) mientras que las células tecaales expresan receptores para la hormona luteinizante (LH). Finalmente, los folículos preovulatorios desarrollan receptores para la hormona luteinizante ocasionando cambios estructurales, biológicos y químicos a fin de garantizar la reanudación del proceso meiótico y concluir con la ovulación (Gigli *et al.*, 2006).

La comunicación estrecha y coordinada entre el ovocito y las células somáticas circundantes garantizan su mutuo desarrollo. El papel que cumplen las células somáticas es proveer al ovocito sustratos metabólicos y señales de detención de la meiosis (Themmen,

2005). Todos los eventos que se susciten en el interior de los folículos son esenciales para el desarrollo continuo y saludable del ovocito y por ende del folículo, por lo que las evidencias apuntan a que el ovocito tiene la capacidad de modular el desarrollo folicular (Webb *et al.*, 2016).

Los factores de crecimiento (Kit ligando, la proteína morfogenética ósea 15 (BMP-15) y factor de diferenciación de crecimiento 9 (GDF-9)) serían los responsables de iniciar el crecimiento de folículos primordiales hasta la etapa antral e independiente de la acción de gonadotropinas. A partir de este momento y de manera cíclica, un subgrupo de folículos antrales grandes son reclutados y continúan su crecimiento por la acción de las gonadotropinas hipofisiarias (FSH y LH) hasta hacerse dominantes algunos folículos como en ovejas y cabras o solo uno como en el caso de la vaca, que concluirán con la ovulación si coinciden con la luteólisis (Rosales *et al.*, 2012).

El desarrollo folicular se acompaña de la activación folicular que se da en dos momentos diferentes y depende de la interacción de factores inhibidores (AMH) o activadores como kit ligando (Driancourt *et al.*, 2000), MBP 15 (Galloway *et al.*, 2002), GDF-9 (Wang & Roy, 2004). El primer momento, llamado también activación inicial, comprende desde la diferenciación de los folículos primordiales hasta la formación de los folículos antrales o terciarios, no dependen de la acción de las gonadotropinas (FSH, LH) y quedan retenidos en esta etapa por tiempo variable hasta la ocurrencia de la segunda activación (Gigli *et al.*, 2006) o también conocido como reclutamiento folicular continuo (McGee y Hsueh, 2000). Cuando un grupo de folículos antrales o terciarios logran cierto tamaño, su crecimiento en adelante requiere de niveles elevados de gonadotropinas correspondiendo a la segunda activación (Gigli *et al.*, 2006) o también conocido como reclutamiento folicular cíclico (McGee y Hsueh, 2000). Al parecer el grupo de folículos cuyo crecimiento dependerá de gonadotropinas deben adquirir un tamaño folicular determinado, el cual varía según cada especie, así en roedores el tamaño folicular se estima en 200  $\mu\text{m}$ , en la marrana 1 mm, en ovejas 2 mm, en mujeres y vacas de 3 a 5 mm y alrededor de 10 mm en yeguas (Monniaux *et al.*, 1997).

El ovocito a medida que crece y madura durante el desarrollo folicular y momentos previos a la ovulación, adquiere la capacidad para reiniciar la meiosis y completarla si se consigue la fecundación (First *et al.*, 1988). La competencia meiótica o la capacidad de

reinicio del proceso meiótico del ovocito (Mehlmann, 2005) requiere tener niveles del factor promotor de la maduración que está constituido por CDK1 y ciclina B; sin embargo, aunque el ovocito es capaz de reiniciar la meiosis, este requerirá un adecuado pico de hormona luteinizante pituitaria (Pepling, 2013). Para lograr una fecundación exitosa, es necesario que el ovocito logre una maduración nuclear y citoplasmática que es de corta duración (horas o días) a diferencia del tiempo que demanda el crecimiento de ovocitos dentro del folículo (semanas o meses) (Songsasen, 2012). Los cambios citoplásmicos incluyen procesos celulares como la transcripción de ARNm (Sirard *et al.*, 1989), la síntesis de proteínas para el reinicio meiótico (Hunter y Moor, 1987; Kastrop *et al.*, 1991), modificación post-traducciona l de proteínas (Levesque y Sirard, 1995) y cambios ultra estructurales (Kruip *et al.*, 1983; Hytell *et al.*, 1986). De otro lado, los procesos de activación y la calidad ovocitaria dependen de diversos factores intra y extra ováricos, genéticos e influencias medioambientales como la temperatura y la nutrición para garantizar las fuentes de energía basándose en glucosa, lípidos y proteínas; así mismo, la demanda energética exige un adecuado soporte mitocondrial, así como la mantención de los procesos de control para contrarrestar los efectos de la oxidación celular (Sutton *et al.*, 2003; Songsasen, 2012; Webb *et al.*, 2016).

Además, la calidad y el potencial de los ovocitos bovinos se mejoran cuanto mayor diámetro folicular como ovocitario logre durante su desarrollo. A mayor calidad, mayor supervivencia embrionaria en etapas iniciales, durante la preñez e incluso la salud en la vida adulta (Lonergan *et al.*, 2003; Krisher, 2004). Por el contrario, una baja calidad ovocitaria está asociada a la alteración del proceso folicular normal con el uso de las biotecnologías reproductivas asistidas como la ovulación múltiple, recolección de células germinales femeninas ovocitos a partir de folículos pequeños para su posterior maduración y fecundación *in vitro* (Krisher, 2004).

Un trabajo experimental demostró que el número de folículos antrales de los ovarios en los fetos bovinos se redujeron hasta el 60 % cuando las vacas gestantes fueron sometidos a una restricción alimentaria durante el primer tercio de la preñez sin que estos efectos influyeran en el peso al nacimiento (Mossa *et al.*, 2013). Así mismo, en ovinos gestantes con restricción energética en la dieta, se afectó el desarrollo de los ovarios con reducción significativa del número de folículos ováricos (Borwick *et al.*, 1997).



### 2.3. Recuento de folículos antrales

El recuento de los folículos antrales en bovinos (RFA, folículos  $\geq 3$  mm de diámetro) varía ampliamente entre individuos (5 a 50) (Evans *et al.*, 2011), los cuales podrían estar influenciadas por la raza y/o subespecies como *Bos taurus* versus *Bos indicus*, donde las diferencias son aún más marcadas (Morotti *et al.*, 2016). Sin embargo, es un rasgo altamente repetible (0.95) en las ondas foliculares dentro de cada individuo que no dependerían de la raza, edad, estación o condiciones de manejo y que persistirían al menos durante un año (Burns *et al.*, 2005); además, están altamente correlacionados con la totalidad de folículos sanos en los ovarios (Evans *et al.*, 2011), ya que vacas con menores RFAs también reflejaron bajas cantidades de folículos primordiales, preantrales y antrales en comparación a aquellas con altos RFAs (Ireland *et al.*, 2008). Esta variabilidad, así como su repetibilidad, no fueron detectadas durante muchos años porque los estudios previos incluyeron folículos  $\geq 5$  o 6 mm de diámetro y no los de menor tamaño (Evans *et al.*, 2011).

De otra parte, el bajo RFA en vacas lecheras se ha asociado con una disminución de la capacidad de respuesta a la superovulación representando una alternativa para la selección fenotípica de las mismas, mediante ultrasonografía (Singh *et al.*, 2004, Ireland *et al.*, 2007); además el bajo RFA han sido asociadas a la baja fertilidad por la presencia de ovarios más pequeños, menor número de folículos y ovocitos en los ovarios (Ireland *et al.*, 2008), menores concentraciones circulantes de progesterona y reducción del espesor endometrial en los primeros 6 días del ciclo estral (Jimenez-Krassel *et al.*, 2009), niveles reducidos de la hormona antimülleriana (Ireland *et al.*, 2008), mayores cantidades de marcadores celulares del cúmulo para la disminución de la calidad de los ovocitos (Ireland *et al.*, 2009) y menores probabilidades de quedar preñadas al final de la temporada de reproducción (Mossa *et al.*, 2012).

En un estudio con 91 vacas lecheras entre primíparas (33) y multíparas (58), el RFA osciló entre 10 y 53 ( $26.1 \pm 1.0$ ) y 6 a 45 ( $23.4 \pm 1.0$ ) en una etapa desconocida del crecimiento folicular y un día esperado de la emergencia de la onda folicular, respectivamente ( $P = 0.02$ ). Así mismo, las concentraciones séricas de HAM (pg/ml) oscilaron entre 13.9 y 528.8 ( $187.3 \pm 13.1$ ) y 38.2 a 774.1 ( $218.7 \pm 14.5$ ) en una etapa desconocida del crecimiento folicular y un día esperado de la emergencia de la onda folicular, respectivamente ( $P < 0.01$ ). Así mismo, las estimaciones de repetibilidad para el RFA y las

concentraciones séricas de HAM entre una etapa desconocida del crecimiento y el día esperado de la emergencia de la onda folicular fueron 0.37 y 0.73 ( $P < 0.01$ ), respectivamente. Finalmente, la correlación entre RFA y HAM fue moderada en una fase desconocida de la onda folicular ( $r = 0.54$ ,  $P < 0.01$ ) y en un día esperado de la emergencia de la onda folicular ( $r = 0.59$ ;  $P < 0.01$ ) (Gobikrushanth *et al.*, 2017).

La hormona antimülleriana (HAM) sérica representa un buen indicador de la dotación de folículos ováricos y contribuye al pronóstico favorable a programas de superestimulación ovárica y embrionaria (Monniaux *et al.*, 2010; Rico *et al.*, 2012), atribuyéndole el mismo nivel de precisión y valor clínico que el RFA para predecir la reserva ovárica en comparación a niveles séricos de FSH y volumen ovárico (Hendriks *et al.*, 2005, 2007; Broer *et al.*, 2009). Considerando la relación de la HAM con la producción de embriones y el RFA, es interesante observar que una única ecografía refleja también el número de folículos antrales reclutados por onda en todos los ciclos reproductivos de la hembra evaluada (Silva-Santos *et al.*, 2013). Por lo tanto, el uso de la ecografía ovárica seriada para determinar pico de RFA durante ondas foliculares y la medición de las concentraciones de HAM representa un método simple, no invasivo para predecir de manera fiable el número relativo de los ovocitos y los folículos morfológicamente sanos en los ovarios de bovinos de 12 a 18 meses de edad (Ireland *et al.*, 2008).

Una investigación utilizó 141 vacas, cuya emergencia de la onda folicular fue sincronizada utilizando progesterona y estradiol, para posteriormente clasificarse y seleccionarse el 10 % superior (alta gama) e inferior (baja gama) del hato según el número de folículos  $\geq 2$  mm. Una nueva sincronización de vacas de alta gama ( $n = 16$ ) y baja gama ( $n = 20$ ) fueron superestimuladas con FSH, dos veces al día por tres días y observaron que las vacas de alta gama tuvieron un mayor número de folículos ( $P < 0.001$ ) respecto a las vacas de baja gama en el momento de la aparición de las ondas después de la primera y segunda sincronización en las categorías de folículos de 2-3 mm y 4-6 mm. Además, el número de folículos 2-3 y 4-6 mm en la emergencia de las ondas después de la primera y segunda sincronización se correlacionó positivamente ( $P < 0.001$ ;  $r = 0.77$  y  $0.71$ , respectivamente). El tratamiento superestimulador resultó en más del doble del número de folículos ( $P < 0.003$ ) en las categorías de 5-7 mm y 8 mm en el grupo de alta gama ( $16.8 \pm 2.2$  versus  $8.1 \pm 0.9$  y  $22.7 \pm 4.1$  frente a  $9.7 \pm 1.6$ , respectivamente). El número de folículos  $\geq 5$  y  $\geq 8$  mm al final

de la superestimulación se correlacionó positivamente ( $P < 0.001$ ) con el número total de folículos  $\geq 2$  mm en el momento de la aparición de las ondas después de la primera ( $r = 0.64$  y  $0.54$ , respectivamente) y segunda sincronización ( $r = 0.65$  y  $0.5$ , respectivamente). Con base a estos resultados, la respuesta superestimuladora puede predecirse ecográficamente por el número de folículos de  $\geq 2$  mm a la aparición de las ondas (Singh *et al.*, 2004).

## **2.4. Ondas foliculares**

La onda folicular se define como el proceso continuo a través del cual un conjunto de folículos ováricos abandonan el estado de reposo para adquirir la capacidad de crecer bajo el estímulo de las gonadotropinas y competitivamente solo uno resalta sobre los demás (especies monovulares) con mayores posibilidades de ovular y fecundarse, mientras que los demás se atresian (Gigli *et al.*, 2006).

### **2.4.1. Ondas foliculares en rumiantes**

La onda folicular en bovinos se caracteriza por el crecimiento simultáneo de un número variable de folículos (8 a 41) de 3 a 4 mm de diámetro detectables por ultrasonografía (Pierson y Ginther 1987; Ginther *et al.*, 1989). Se inicia después de la ovulación, así mismo, el crecimiento folicular en la onda se acompaña de la reanudación meiótica favorecida por la FSH y la función activa de las células de la granulosa, que en bovinos, se estima a partir del segundo día del ciclo estrual y varía ligeramente por el número de ondas/ciclo (4 a 6 d) (Gigli *et al.*, 2006).

El ciclo estrual bovino presenta de dos a tres ondas foliculares, el cual depende de la acción y tiempo de vida del cuerpo lúteo en el ciclo estrual (Lucy *et al.*, 1992). La disminución de los niveles de la progesterona coincidente con el retroceso del cuerpo lúteo en bovinos que se encuentran desarrollando la segunda o tercera onda, favorecerá que el folículo más grande en ese momento, continúe su crecimiento hasta lograr su ovulación (Gigli *et al.*, 2006).

El crecimiento de los folículos cuya duración puede variar entre cinco a siete días, conocida comúnmente como onda folicular, correspondería a una etapa acelerada donde los folículos antrales experimentan un crecimiento bastante notorio; sin embargo, previo a ello, existe un crecimiento folicular bastante lento con una duración de hasta un mes (Lussier *et al.*, 1987). Por lo tanto, el tiempo que demandaría a los folículos antrales más

pequeños (0.2mm) completar su crecimiento y adquirir su capacidad ovulatoria es de 40 días (Gigli *et al.*, 2006).

#### **2.4.2. Ondas foliculares en camélidos sudamericanos**

Las ondas foliculares en los camélidos sudamericanos se desarrollan en forma de ondas cíclicas (Bravo y Sumar, 1989). La duración de una onda folicular completa está determinada desde el momento en que un folículo de 3 mm de tamaño crece y posteriormente, este se reduce a 3 mm al regresar, siempre y cuando no exista ovulación (Bravo *et al.*, 1990).

La duración de la onda folicular fue estimada mediante ecografía en  $11.1 \pm 1.2$  días (Hanco *et al.*, 2015). Sin embargo, la corta o larga duración de la onda folicular en camélidos al parecer depende del menor o mayor tamaño que alcanza el folículo dominante (Adams, 2001).

La onda folicular en camélidos sudamericanos tiene tres fases: crecimiento, estática o de madurez y regresión. En alpacas, la fase de crecimiento folicular demandó  $4.9 \pm 0.9$  días (Hanco *et al.*, 2015), un rango de 3 a 5 días (Bravo y Sumar, 1989) y con una tasa de crecimiento folicular de  $1.4 \pm 0.3$  mm/día (Vaughan *et al.*, 2004) mientras que, en llamas adultas no preñadas y no lactantes fue de  $9.2 \pm 2.8$  días (Chaves *et al.*, 2002). La duración de la fase estática en alpacas fue estimada en  $3.6 \pm 0.6$  días (Hanco *et al.*, 2015) o un rango de 2 a 8 días (Bravo y Sumar, 1989) y en llamas en  $5.2 \pm 1.4$  días (Chaves *et al.*, 2002). Finalmente, la fase de regresión tuvo una duración de  $2.8 \pm 0.6$  días (Hanco *et al.*, 2015) hasta 4 días en alpacas (Bravo y Sumar, 1989) y en  $8.2 \pm 2.2$  días en llamas (Chaves *et al.*, 2002). La regresión o atresia del folículo dominante ocurre cuando no se produce la ovulación, permitiendo la aparición de uno nuevo en el transcurso del segundo a tercer día de haberse producido su reducción diametral (Bravo *et al.*, 1990).

El inicio de la onda folicular en alpacas está marcada por el surgimiento simultáneo de varios folículos (8-10 folículos) con diámetros menores de 3 mm, seguido de un crecimiento continuo de por lo general uno, pero a veces dos o tres folículos hasta 3-5 mm de diámetro. La mayoría de los folículos crecen o mantienen su tamaño durante los primeros 8 días después de la emergencia (Vaughan *et al.*, 2004). El futuro folículo que

será dominante continúa el crecimiento, mientras que los demás (folículos subordinados) regresionan por atresia (Adams *et al.*, 1990; Vaughan *et al.*, 2004).

El tiempo estimado para los intervalos inter onda tuvo una duración de 12 o 16 días y ocasionalmente 18, 20 y 22 días, siempre y cuando el folículo dominante de la onda no ovule. Esta variación es observada entre diferentes y dentro de las mismas alpacas. Así mismo, la amplitud del intervalo interonda está relacionado directamente con el diámetro máximo del folículo alcanzado en su proceso formativo (Vaughan *et al.*, 2004).

De otro lado, el intervalo desde el tratamiento a la emergencia folicular por ecografía en alpacas (n = 60) con 0.004 mg de acetato de buserelina por vía IM fue en promedio de  $4.3 \pm 1.4$  días y el intervalo desde el tratamiento hasta que el folículo dominante logró  $\geq 7$  mm de diámetro fue en promedio a los  $9.0 \pm 1.6$  días (Andrade, 2007).

## **2.5. Ovulación**

La ovulación en alpacas y llamas ocurre de diversas maneras. La ovulación de manera natural ocurre de 26 a 30 h después del estímulo de la cópula (Adams *et al.*, 1990) y artificialmente (24 a 30 h) mediante hormonas gonadotrópicas (hCG, GnRH y LH) o sus análogos (Aller *et al.*, 1999; Huanca *et al.*, 2001). Asimismo, se ha utilizado plasma seminal de la misma especie, consiguiéndose ovulaciones hasta del 100 % en comparación de solo 25 % con plasma seminal de toros en la ovulación de alpacas y llamas previamente sincronizadas para el inicio de la onda folicular y en presencia de folículos  $\geq 7$  mm (López *et al.*, 2006). De otro lado, reportan que el 5 % (1/20) de alpacas presentaron ovulación espontánea atribuida probablemente a estímulos olfatorios, auditivos y visuales (Fernández Baca *et al.*, 1970).

La mayoría de los folículos con diámetros de 6 o 7 mm de diámetro logrados en 6 a 8 días de crecimiento ya poseen la capacidad de ovular (Vaughan *et al.*, 2003). Así mismo, el diámetro máximo promedio del folículo dominante en alpacas fue determinada en  $8.8 \pm 0.3$  mm (n = 38) (Vaughan *et al.*, 2004) o de 9 mm (8-12 mm) (Aba, 2014).

Tras los supuestos de la existencia de un compuesto en el plasma seminal de los camélidos sudamericanos o especies de ovulación inducida al que se le llamó primariamente como el Factor Inductor de la Ovulación (FIO), hoy en día se conoce que se trata de una neurotrofina llamada subunidad  $\beta$  del factor de crecimiento nervioso ( $\beta$ -NGF), con un peso

molecular de 13,221 Da y una secuencia de 12–23 aminoácidos; este factor fue aislado del semen de llamas y con efectos en la liberación de LH y consecuente ovulación en las llamas (Ratto *et al.*, 2012). Recientemente se ha postulado la acción central de  $\beta$ -NGF en la modulación y activación del eje reproductivo de los ovuladores inducidos que apuntan al rol que cumplen las neuronas hipotalámicas que expresan kisspeptina como un potente estimulador de GnRH / LH, en los camellos (El Allali *et al.*, 2017).

## **2.6. Gonadotropina coriónica equina (eCG)**

La eCG es una glicoproteína descubierta por Cole y Hart aún en la década de los años 30 del siglo anterior, producida por la yegua preñada entre los días 46 y 130 de la gestación (Papkoff, 1978; González-Mencio *et al.*, 1978). La molécula de eCG tiene un efecto biológico similar a la FSH y la LH en especies diferentes a los equinos (Martinuk *et al.*, 1991), efecto atribuido a la sub unidad  $\alpha$ , mientras que la subunidad  $\beta$  ocasiona el efecto prolongado aunado a la presencia de ácido siálico (desde 40 h hasta 10 d) (Schams *et al.*, 1978). La ventaja es su bajo costo, además la administración de dosis única provoca una buena respuesta ovárica en los tratamientos superovulatorios. La desventaja radica en el sobre crecimiento folicular después de la ovulación, incrementándose los niveles de estrógenos y afectando la recuperación embrionaria por sus efectos sobre su desarrollo inicial, su transporte oviductal y alterando la morfofisiología del útero (Roche e Ireland, 1984). Esos problemas podrían limitarse si se usaran sustancias que bloqueen estos efectos adversos como el antisuero anti-eCG y anticuerpos monoclonales anti-eCG (Gonzalez *et al.*, 1994a; Gonzalez *et al.*, 1994b).

La estimulación ovárica con preparaciones comerciales de gonadotropina coriónica equina (eCG) produce respuestas extremadamente variables en animales domésticos, que van desde estimulación excesiva hasta prácticamente ninguna estimulación, cuando se aplican sobre la base de su unidad unitaria declarada (Alvarez *et al.*, 2016). En principio, los ensayos de calidad llevados a cabo por diferentes fabricantes de eCG comercial deberían garantizar la potencia necesaria de los productos (Lecompte *et al.*, 1998). Sin embargo, se sabe poco sobre las características de las preparaciones purificadas de eCG y las limitaciones en el proceso de control de calidad; por lo que, los cambios en el perfil fisicoquímico de los

diferentes lotes de diversos fabricantes serían los responsables de ocasionar la alta variación en la respuesta ovárica en hembras tratadas (Alvarez *et al.*, 2016).

En la actualidad, los productos comerciales de eCG que se emplean en medicina veterinaria son preparaciones parcialmente purificadas a partir de sangre de yeguas gestantes (PMSG), con el inconveniente de la variabilidad de lote a lote, en vista de que el perfil de glicosilación varía entre animales y entre sueros sanguíneos en razón al curso evolutivo de la gestación. Por otra parte, se podría correr el riesgo de que los preparados comerciales contengan contaminantes (virus, priones, entre otros) que pongan en riesgo la salud de los animales usuarios. Por lo tanto, se están realizando estudios para obtener eCG recombinante (Villarraza, 2016).

La actividad LH de la eCG, lejos de ser una ventaja, se le ha atribuido la responsabilidad de provocar prematuramente el reinicio meiótico del ovocito, ocasionando aneuploidia y problemas asociados al desarrollo embrionario temprano (Monniaux *et al.*, 1984).

## **2.7. Superovulación y producción de embriones en camélidos sudamericanos**

Los enfoques de la superestimulación ovárica en los camélidos han sido adaptados mayoritariamente a partir de protocolos usados en los rumiantes (Tibary *et al.*, 2015). Por esta razón, las alpacas no comparten características comunes con otros rumiantes por lo que difieren en su fisiología reproductiva, siendo necesario el desarrollo de estrategias específicas para la especie (Vivanco, 2013). Por lo tanto, la optimización de los programas de transferencia de embriones (TE) requiere un conocimiento profundo de los mecanismos fisiológicos que controlan la dinámica folicular, la ovulación, la fecundación, el desarrollo temprano del embrión y el reconocimiento materno de la preñez (Tibary *et al.*, 2015).

El uso de hormonas superovulatorias permite incrementar el número de folículos reclutados en el inicio de una nueva onda folicular; sin embargo, se corre el riesgo de que algunos folículos estimulados artificialmente pueden contener ovocitos anormales, ovocitos con deficiente maduración citoplasmática y/o nuclear, que a su vez puede afectar la tasa de fecundación y el desarrollo embrionario (Sirard *et al.*, 2000).

Las hormonas de mayor uso son FSH y eCG, solas o combinadas. Así mismo, la respuesta a estas hormonas depende del momento de inicio en relación con la dinámica folicular, la dosis, el horario de administración y la variación individual (Tibary *et al.*, 2015).

Aunque los tratamientos de FSH y eCG se han iniciado durante la fase receptiva o luteal del ciclo con cierto éxito, se consiguen mejores respuestas cuando el procedimiento se inicia en ausencia de folículos mayores de 2 mm (Tibary y Anouassi, 1997; Tibary *et al.*, 2007).

La superestimulación con eCG se ha utilizado ampliamente en los camélidos. En general, se administra una dosis única intramuscular, un día antes o el día de la culminación de un régimen de progesterona de 5 a 15 días (Tibary *et al.*, 2015) o inicios de la onda folicular con dosis de 400 a 750 UI, incluso 1000 UI en alpacas (Correa *et al.*, 1994; Mendoza, 2012; Ancco y Olivera, 2013; Ratto *et al.*, 2013; Vivanco, 2013). La tabla 1, resume la respuesta ovárica y embrionaria con eCG en alpacas y la tabla 2 en llamas.



Tabla 1. Respuesta ovárica y embrionaria con eCG en alpacas

Dosis (UI)	Estado de crecimiento folicular	Método de control del crecimiento folicular	Folículos	Cuerpos lúteos	Recolección de Embriones	Referencias
400 UI x 3d SC	Folículo < 7mm	-	-	-	03 embriones /alpaca	Novoa y Sumar (1968)
1500 UI	Sincronización de onda folicular	12.5 mg de Progesterona/día/12 días	-	-	Prom.: ninguno Nota: La eCG se aplicó después del tratamiento con P4	(Correa <i>et al.</i> , 1994)
1000 UI	Inicio de onda folicular	Inducción de la ovulación GnRH	5.4 ± 0.99	5.3 ± 0.89	1.3 ± 0.25 embriones	(Bourke et al., 1995b)
1000 UI	Inicio de onda folicular	CL artificial Norgestomet 3 mg SC x 7d	3.3 ± 0.58	2.4 ± 0.55	1.4 ± 0.45 embriones	
750 UI (D0) + 750 UI hCG (D5)	Folículo < 7mm	-	-	6.8 ± 2.6 CLs		(Novoa et al., 1999)
500 UI (D0) + 750 UI hCG (D5)	Folículo < 7mm	-	-	6.0 ± 2.8 CLs		
750 UI (D0) + 1000 UI eCG (D5)	Folículo < 7mm	-	-	12.6 ± 1.8 CLs	31/126 embriones	
500 UI	Sincronización de onda folicular	CL artificial, CIDR x 5d.	5.25 ± 2.5	-	2.12 ± 2.9 embriones	(Agüero et al., 1999)
500 UI eCG + 50 mg FSHp	Sincronización de onda folicular	CL artificial, CIDR x 5d.	5.94 ± 1.71	-	1.94 ± 2.74 embriones	
	Inicio de emergencia folicular	-	Prom.: 7.5 ± 1.2	Prom.: 5.9 ± 1.3 CLs	Prom.: 1.6 ± 0.3 embriones Tasa de recuperación: 23.6% Tasa de preñez: 30.0%	(Huanca <i>et al.</i> , 2006)
750 UI	Inicio de emergencia folicular	Inducción de la ovulación con 4µg de acetato de buserelina	<7 mm: 3.17 ± 0.86 Fol. 5.47 ± 0.12 mm  7-13 mm: 9.74 ± 1.27 Fol. 9.01 ± 0.21 mm  >13 mm: 0.98 ± 0.33 Fol. 14.58 ± 0.4 mm	Prom.: 9.92 ± 0.99 CLs	Prom.: 2.73 ± 0.39 embriones Grado de desarrollo: Blastocisto: 2.25 ± 0.42 Mórula : 0.48 ± 0.20 Calidad: Excelente: 1.03 ± 0.3 Bueno: 0.69 ± 0.36 Regular: 0.19 ± 0.14 Malo: 0.80 ± 0.31	(Huanca, 2008)
650 UI	Inicio de emergencia folicular	Inducción de la ovulación con 0.0042 mg de acetato de buserelina	Prom.: 9.6 ± 2.4 Fol.	Prom.: 8.7 ± 2.1 CLs	Prom.: 4.3 ± 2.4 embriones Folículos anovulatorios: 0.9 ± 1.6	(Cervantes, 2008)
				Prom.: 6.75 ± 2.38	Prom.: 3.25 ± 2.19 embriones	(Ponce, 2010)

Tabla 1. (Continuación)

700 UI	Inicio de emergencia folicular	Inducción de la ovulación con 0.0042 mg de acetato de buserelina	Prom.: 10.20 ± 4.47 Fol. Prom.: 8.75 ± 0.51 mm	Prom.: 8.00 ± 3.42 CLs Prom.: 12.57 ± 0.67 mm	Total: 18 embriones (1 a 7 Emb./alpaca Total embriones Transf.: 11 Grado de desarrollo: 16 Blast. y 02 Mórula	(Mendoza, 2012)
1000 UI	Inicio de emergencia folicular	CL natural por monta con macho vasectomizado más inducción de la ovulación con GnRH o hCG		Año 2010: Prom.: 6.70 ± 2.20 CLs  Año 2012: Prom.: 6.00 ± 2.01 CLs  Año 2013-I: Prom.: 6.88 ± 2.15 CLs  Año 2013-II: Prom.: 6.81 ± 3.22 CLs	Prom.: 3.52 ± 3.01 embriones Prom. Embriones Transf.: 3.0 ± 2.87  Prom.: 2.50 ± 2.28 embriones Prom. Embriones Transf.: 1.5 ± 2.00  Prom.: 4.18 ± 5.11 embriones Prom. Embriones Transf.: 3.80 ± 4.87  Prom.: 3.69 ± 3.42 embriones Prom. Embriones Transf.: 3.13 ± 3.24	(Vivanco, 2013)
				Años 2004-2007: n = 1636 alpacas Total CL: 10,796 Prom.: 6.59 ± 4.78 Ovul./alpaca	Total: 4,188 embriones Prom.: 2.57 ± 3.01 embriones Tasa de recuperación: 41.4 ± 32.2% Recuperación por N° embriones: 0 Emb.: 548 alpacas (33.5%) 1 Emb.: 268 alpacas (16.4%) ≥2 Emb. (Máx. 21): 820 alpacas (50.1%) Tasa de preñez por calidad emb. Transf.: 3386 Grado 1: 1553 crías 915 Grado 2: 286 crías 111 Grado 3: 31 crías 109 Grado 4: 17 crías	(Vaughan <i>et al.</i> , 2013)
1000 UI	Inicio de emergencia folicular			Acetato de buserelina (n = 10): Prom.: 7.8 ± 3.99 CLs  LH estándar (n = 11): Prom.: 6.73 ± 1.49 CLs	Prom.: 2.7 ± 4.08 embriones Tasa de recuperación: 34.6% Folículos no ovulados total: 3.6 ± 2.95 < 6 mm: 0.5 ± 0.85 ≥ 6 mm y ≤ 14 mm: 1.8 ± 1.9 ≥ 15mm: 1.3 ± 2.1 Prom.: 4.0 ± 2.57 embriones Tasa de recuperación: 59.4% Folículos no ovulados total: 0.64 ± 0.81 < 6 mm: 0.0 ± 0.0 ≥ 6 mm ≤ 14 mm: 0.36 ± 0.67 ≥ 15mm: 0.27 ± 0.47	(Vivanco <i>et al.</i> , 2014a)
1000 UI	Inicio de emergencia folicular	CL natural por monta con macho vasectomizado más inducción de la ovulación con 0.0084 mg de acetato de buserelina		Colectas sucesivas (40d): 1a. Colecta: 6.88 ± 2.15 CLs  2a. Colecta: 6.94 ± 3.17 CLs	Embriones transferibles: Prom.: 4.35 ± 5.13  Prom.: 3.35 ± 3.22	(Vivanco <i>et al.</i> , 2014b)

Tabla 2. Protocolos de estimulación ovárica en llamas con eCG

Estado de crecimiento folicular	Método de control del crecimiento folicular	Folículos $\geq 7$ mm	Embriones/donadora	Referencia
Inhibición del folículo dominante	Benzoato de estradiol + CIDR	$4.2 \pm 1.9$	1.8 Embr. viables/donadora	(Aller <i>et al.</i> , 2002)
Emergencia de la onda	Inducción de la ovulación con LH	$16.6 \pm 5.3$	4.8 Embr. viables/donadora	(Huanca <i>et al.</i> , 2009)
Emergencia de la onda	Inducción de la ovulación con LH + acetato de medroxiprogesterona	$12.9 \pm 3.7$	3.5 Embr. Viables/donadora	(Huanca <i>et al.</i> , 2009)
Emergencia de la onda	Fase 1: Inducción de la ovulación con LH Fase 2: Inducción de la ovulación con LH y régimen de progesterona con esponja vaginal.	$11.7 \pm 7.53$ $6.13 \pm 7.11$	$3.47 \pm 4.26$ Embr./donadora $1.33 \pm 2.53$ Embr./donadora	Evangelista <i>et al.</i> , 2009
Emergencia de la onda	Acetato de medroxiprogesterona	$9.4 \pm 1.0$	1.1 Embr. Viables/donadora	(Aller <i>et al.</i> , 2010)
Emergencia de la onda	Benzoato de estradiol + acetato de medroxiprogesterona	$12.4 \pm 1.0$	2.4 Embr. Viables/donadora	(Aller <i>et al.</i> , 2010)
Inhibición del folículo dominante	Benzoato de estradiol	$4.4 \pm 0.9$	1.6 Embr. Viables/donadora	(Carretero <i>et al.</i> , 2010)
Inhibición del folículo dominante	Benzoato de estradiol + progesterona	$4.8 \pm 0.7$	1.9 Embr. Viables/donadora	(Carretero <i>et al.</i> , 2010)
Ausencia de folículo dominante	Verificado por ultrasonido	$4.6 \pm 0.6$	2.2 Embr. Viables/donadora	(Carretero <i>et al.</i> , 2010)
Ausencia de folículo dominante	Verificado por ultrasonido	No reporta	3.0 Embr. Viables/donadora	(Trasorras <i>et al.</i> , 2010)

Adaptado de Ratto *et al.* (2013)

Entre los factores y causas de esta variabilidad ovárica y embrionaria se mencionan:

- La ovocaptación del oviducto a partir de ovarios superestimulados (Taylor *et al.*, 2001; Novoa *et al.*, 1999) o durante la colecta embrionaria cuya cantidad recuperada tiene una correlación negativa ( $r = -0.26$ ,  $P \leq 0.001$ ) con la presencia de folículos grandes en los ovarios (Vivanco *et al.*, 2014a).
- Medios y técnicas de recuperación embrionaria (Bourke *et al.*, 1995a; Ratto *et al.*, 1999; Huanca *et al.*, 2006).

- La alta incidencia de luteinización folicular y alteración de la ovulación, probablemente debido a la larga vida media de la eCG (Tibary *et al.*, 2015).
- El tiempo para la colección embrionaria desde el apareamiento. Los embriones ingresan al útero, 6-6.5 días después del apareamiento en la etapa de blastocisto eclosionado (Bourke *et al.*, 1991). A nivel del istmo del tubo ovárico, los embriones son sometidos a una selección fisiológica que podría reducir su cantidad (Novoa *et al.*, 1999). Aunque los blastocistos pueden recuperarse de la cavidad uterina tan temprano como 6 días después de la cópula en llamas (Carretero *et al.*, 2010), en alpacas hasta el día 5 a partir del oviducto y desde el día 6 después del servicio desde los cuernos uterinos (Cervantes *et al.*, 2011). Así mismo, un estudio previo reportó la colección de blastocistos ovoides a tubulares al día 10 después de apareamiento y blastocistos filamentosos del día 11 al 15 (Cárdenas, 1997).
- El estado ovárico al comienzo del tratamiento superovulatorio, uso de hormonas solas o combinadas y su grado de pureza, condición corporal inadecuada, estaciones y condiciones ambientales como la época lluviosa o época seca, edad de los animales, tratamientos repetidos, condiciones de estrés y cría de animales antes, durante y después de un programa OMTE, experiencia del personal y en gestión de donantes, calidad espermática (Reyna, 2006). Sin embargo, trabajos hechos fuera de los andes peruanos indican que el número, calidad, diámetro de embriones y tasa ovulatoria no fueron afectados por la temporada, lactancia y condición corporal en las alpacas (Vaughan *et al.*, 2013).

Los tratamientos superestimulatorios en los camélidos generan muchas interrogantes aún sin dilucidarse (Tibary *et al.*, 2015). Los principales problemas que deben abordarse son: variabilidades debidas a las especies (alpaca vs. llama), raza (huacaya vs. suri), edad, estado de lactancia, condición corporal, condiciones ambientales, preparaciones y protocolos hormonales (Sumar, 2013). Así mismo, la mayor presentación de hembras no receptivas (20 a 30 %), la ocurrencia de luteinización folicular, la hiperestimulación en algunas hembras y la pérdida de eficacia farmacéutica después de múltiples tratamientos y la baja frecuencia de recuperación embrionaria (Vivanco *et al.*, 2014b). Además, se deben incluir estudios del

sistema de notificación más uniforme para los protocolos de superestimulación, la gestión de apareamiento de donantes y el tiempo de recolección de embriones (Tibary *et al.*, 2015).

## **2.8. La ultrasonografía y su aplicación en los camélidos sudamericanos**

Los sonidos audibles por el oído humano van desde 20 a 20,000 ciclos/s o hasta 20 kHz (Penninck & d'Anjou, 2015). Por lo tanto, sonidos más allá de este rango son considerados como ultrasonidos (Penninck & d'Anjou, 2015) y son ondas de muy alta frecuencia imperceptibles por el oído humano, capaces de producir una imagen diagnóstica (Easton, 2012). Las frecuencias de ultrasonido de diagnóstico varían de 2 a 15 (MHz) (Kealy *et al.*, 2011).

Antes de la llegada de la ecografía, la evaluación de los órganos reproductivos (Ej. Ovarios), se limitó al uso de técnicas como la palpación rectal, laparoscopia o examen visual de ovarios extirpados (Terzano, 2012).

El uso de la técnica ecográfica se está generalizando cada vez más en la clínica veterinaria por considerarse una herramienta no invasiva, flexible, relativamente segura (Kealy *et al.*, 2011), de imagen simple y confiable (Terzano, 2012). En este sentido, se reporta una alta fiabilidad del uso de esta herramienta, encontrándose una relación lineal entre el diámetro del folículo medido por ultrasonografía *in vivo* y el diámetro del folículo determinado después del sacrificio (Driancourt *et al.*, 1991).

Actualmente los principales usos de esta técnica son: evaluación del tracto reproductivo, diagnóstico de gestación, estimación de la edad fetal, evaluación del crecimiento fetal y la viabilidad fetal, evaluación dinámica folicular y uterina, detección de la ovulación, evaluación de tratamientos superovulatorios y aspiración folicular (Parraguez *et al.*, 2010).

Los transductores vienen en una variedad de tamaños y formas, según el tipo de examen y la frecuencia requerida. La frecuencia también debe seleccionarse según los detalles requeridos y el tamaño del paciente (Easton, 2012).

Para uso transrectal, es ideal una sonda delgada lineal o convexa de matriz o curvilínea con una frecuencia entre 5 y 7,5 MHz. Estas características aseguran una imagen clara y bien definida con suficiente penetración de profundidad para examinar todo el tracto reproductivo de la hembra (Parraguez *et al.*, 2010).

Tabla 3. Características e indicaciones de transductores con diferentes frecuencias usadas en teriogenología

3.0 MHz	5.0 MHz	7.5 MHz
Mejor profundidad de campo (0 a 20 cm)	Intermedio profundidad de campo (0 a 12 cm)	Reducida profundidad de campo (0 a 7 cm)
Baja resolución	Buena resolución	Alta resolución
Gestación avanzada	Diagnóstico de preñez rutinario	Diagnóstico temprano de la preñez
Útero post parto	Determinación de sexo fetal	Determinación de sexo fetal

Carrière, DesCôteaux y Durocher (2005)

La exploración ultrasónica en modo B en tiempo real ha demostrado ser una técnica muy útil para la evaluación del estado reproductivo en camélidos hembras (Parraguez *et al.*, 2010). Las ecografías ováricas en llamas con transductores de 5 MHz permitieron detectar folículos  $\geq 3$  mm (Bravo *et al.*, 1990) y con transductores de 7 MHz folículos de hasta  $\geq 2$  mm de diámetro en alpacas (Pacheco *et al.*, 2017).

Los ovarios de llama y alpaca son redondos a ovales y de forma globular, contienen numerosos folículos en la superficie. El tamaño ovárico depende de las estructuras presentes, pero en general el promedio de la longitud de los ovarios es de 1.8 cm. Se pueden detectar varios folículos llenos de líquido con un diámetro de 2 a 10 mm, en presencia o ausencia de un cuerpo lúteo (CL). Los folículos están dispuestos característicamente a lo largo de la periferia del ovario y los folículos grandes y el cuerpo lúteo sobresale claramente de la superficie ovárica. El cuerpo lúteo maduro tiene un diámetro de 11 a 13 mm y es característicamente una estructura hipoecogénica bien delineada con un área horizontal blanca (ecogénica) en el centro. La ecotextura del útero y el cuello uterino es más oscura durante el dominio folicular que durante el dominio lúteo, lo que indica un aumento en el líquido intercelular (edema) durante el dominio folicular (Parraguez *et al.*, 2010).

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. Ubicación**

La presente investigación se desarrolló en el Centro de Investigación y Producción (CIP) “Chuquibambilla”, de la Universidad Nacional del Altiplano (UNA), situado en el Departamento de Puno, Provincia de Melgar (Perú), a 3974 m.s.n.m., 14°47’37” Latitud Sur y a 70°47’50” Longitud Oeste, entre enero a abril del año 2016. La temperatura máxima y mínima registrada fue de 16.61 °C y 4.76 °C en el mes de febrero y de 8.5 °C, 2.26 °C en marzo (SENAMHI, 2016; Estación Meteorológica Chuquibambilla).

#### **3.2. Animales**

Se utilizaron 26 alpacas hembras suri seleccionadas de un total de 34 alpacas con ondas foliculares presentes. La edad de las alpacas seleccionadas osciló entre 4 a 7 años (Mediana = 4.62 años), con una condición corporal de 2.5 a 3.5 (mediana = 3) sobre la base de una escala de 1 a 5 (Van Saun & Herdt, 2014), peso promedio ( $\pm$  D.E.) de  $69.23 \pm 7.46$  Kg., con antecedentes de un parto como mínimo, sin ningún problema aparente de tipo reproductivo y vacías.

Así mismo, se dispuso de 10 alpacas machos de la variedad suri para el empadre, entre 04 y 08 años de edad, una condición corporal de 2.75 a 4 basándose en una escala de 1 a 5 (Van Saun & Herdt, 2014),  $75.8 \pm 8.04$  Kg de peso en promedio y fertilidad comprobada.

Todos los animales fueron alimentados en áreas con pastura natural y en ocasiones con heno de avena. Las prácticas de manejo para las alpacas de los grupos experimentales también fueron similares para todos los animales mientras duró el experimento. Además, fueron identificadas con collares de color numerados según al grupo experimental al que correspondieron.

### **3.3. Procedimiento metodológico**

El diseño de investigación utilizado fue el diseño cuasiexperimental. Las alpacas fueron asignadas a los grupos experimentales a través de la asignación muestral no aleatoria en función al mayor y menor número de folículos emergentes  $\geq 3$  mm en la onda folicular.

#### **3.3.1. Selección de animales**

Inicialmente 34 alpacas hembras fueron ecografiadas transrectalmente cada dos días, utilizando un ecógrafo ALOKA SSD500 y un transductor lineal rectal de 5.0 MHz a fin de localizarse un folículo ovárico preovulatorio  $\geq 7$  mm de diámetro. A partir de dicho tamaño folicular, las alpacas recibieron 0.0042 mg de acetato de buserelina (AB, Conceptal®, Intervet, 1 ml IM), constituyendo el día cero para el inicio de la onda folicular. La dosis de AB posibilitó la inducción de la ovulación, dosis ovulatoria sugerida por Huanca *et al.* (2001). La ocurrencia de la ovulación con el análogo de la GnRH entre 24 a 30 h (Aller *et al.*, 1999; Huanca *et al.*, 2001), fue verificada a los dos días con la desaparición del folículo dominante en el ovario mediante ecografía. El folículo dominante de la primera onda folicular en las alpacas, fue evaluada retrospectivamente, como Adams (1990) lo hiciera en llamas, determinándose el inicio de dicha onda con la aparición de folículos emergentes  $\geq 3$  mm. Este procedimiento, fue realizada a partir de las observaciones ecográficas inter diarias registradas en un esquema ovárico (Anexo 1A; Figura 1A) donde a partir del hilio ovárico como punto de referencia, se establecieron cuatro planos ováricos para la localización y seguimiento de



los folículos y cuerpo lúteo: plano superior izquierda, superior derecha, inferior izquierda e inferior derecha. Todo el procedimiento anterior, posibilitó la conformación de dos grupos experimentales (GEs):

- Grupo Experimental 01 (GE01): 15 alpacas con menor e igual a tres folículos emergentes  $\geq 3$  mm de diámetro pos inducción de la ovulación.
- Grupo Experimental 02 (GE02): 11 alpacas con mayor e igual a cuatro folículos emergentes  $\geq 3$  mm de diámetro pos inducción de la ovulación.

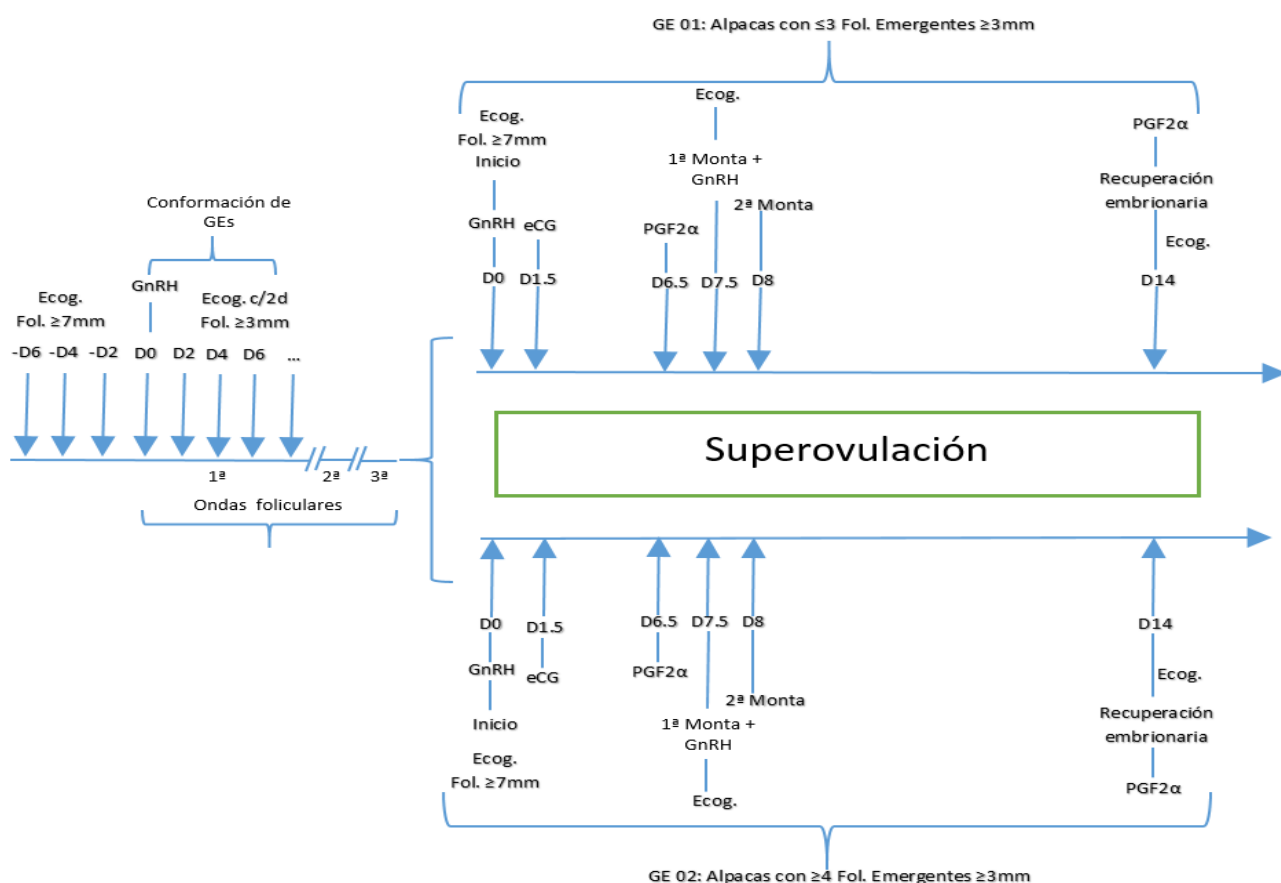


Figura 1. Esquema de trabajo

Las alpacas seleccionadas en los respectivos GEs fueron evaluadas ecográficamente en forma inter diaria durante dos ondas foliculares como parte de la fase pre-

experimental. Posteriormente a la observación de un folículo ovárico  $\geq 7$  mm, se procedió a iniciar el programa de superovulación.

Los folículos ováricos producto de la súper ovulación fueron visualizadas ecográficamente como estructuras anecogénicas, medidas en su diámetro y registradas en un diagrama ovárico (Anexo 1A). Así mismo, los cuerpos lúteos fueron visualizados ecográficamente como estructuras hipoeogénicas, contadas y medidas en su diámetro máximo.

### **3.3.2. Superovulación**

El protocolo de superovulación de los GEs fue el reportado por Huanca *et al.* (2009) y Cervantes *et al.* (2011). Se determinó por ultrasonografía la presencia de un folículo preovulatorio  $\geq 7$  mm de diámetro en los ovarios de las alpacas de la tercera onda folicular. Se administró un análogo de GnRH (0.0042 mg acetato de buserelina, Conceptal®, Intervet, 1 ml, IM) para inducir ovulación, representando el día cero (D 0). A las 36 h post-administración del agente inductor al D 0, se hizo la ecografía para verificar la ovulación mediante la desaparición del folículo dominante en el ovario que lo contenía y se administró eCG en dosis única (700 UI eCG, Novormon® Syntex, 3.5 ml, IM) como agente superovulatorio. Al D 6.5 pos inducción de la ovulación, se administró cloprostenol (0.25 mg, Lutaprost®250, Agroveter Market, 1 ml, IM) para producir la luteólisis del cuerpo lúteo originado por la inducción de la ovulación del folículo preovulatorio del D 0, dosis y tiempo suficiente como lo descrito por Mamani *et al* (2016). Al D 7.5 se registró el número y tamaño de los folículos mediante ecografía (Anexo 2A; Figura 2A) e inmediatamente después fueron cubiertas con machos fértiles por 15 minutos como mínimo, previa verificación de una monta correcta. Luego de la monta se administró 0.0042 mg. de Acetato de Buserelina (Conceptal®, Intervet, 1 ml, IM) para garantizar la ovulación. A las 12 h posterior a la primera monta se realizó una segunda de igual duración que la primera, con la finalidad de mejorar la concepción.

### **3.3.3. Colección embrionaria**

La colección de embriones se realizó a los seis días y medio de la primera monta (o D14) y previo a ella se realizó una evaluación ecográfica transrectal para registrar la cantidad y dimensión de los cuerpos lúteos (Anexo 2A; Figura 3A) para tener una idea previa del número de embriones a recolectar, así mismo se registraron estructuras

ováricas anexas al ovario como folículos anovulatorios y luteinizados (Figura 4A). El medio de lavado fue preparado en el Laboratorio de Reproducción de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, conteniendo PBS y enriquecido con albúmina sérica y antibióticos.

Para el lavado intrauterino se administró previamente un tranquilizante basado en acepromazina maleato (Promazil®, Montana, 0.5 ml, IM) y anestesia epidural baja con lidocaína 2% (2.5 ml) en el espacio sacro coccígeo. Se utilizó un catéter Foley Nro. 16 Fr de dos vías fijada internamente por un mandril metálico y protegido por una camiseta sanitaria. El ingreso del catéter por el cérvix fue facilitado mediante su fijación manual vía rectal. Una vez que el catéter se ubicara en uno de los cuernos uterinos, se infló el balón del catéter con 15 a 20 ml de aire para asegurarlo al cuerno uterino impidiendo el reflujo del medio y embriones durante el lavado. Este procedimiento se repitió para el otro cuerno uterino.

El lavado intrauterino se hizo a través del sistema discontinuo, utilizando una jeringa de 50 ml; es decir, se suministró medio intrauterinamente para luego ser recuperado después de un leve masaje por vía transrectal, repitiéndose varias veces. Se utilizó 120 ml de medio de lavado temperado (37 °C) por cada cuerno y 30 ml para el enjuague del catéter después de haberlo extraído del tracto reproductivo. El medio de lavado recuperado fue colocado en filtros Encom con 70 µm de diámetro, luego transferido a placas petri y colocado en una platina térmica para la búsqueda y evaluación de los embriones. Terminada la recuperación embrionaria por lavado intrauterino, se aplicó cloprostenol (0.25 mg, Lutaprost®250, Agrovit Market, 1 ml, IM) para inducir la luteólisis de los cuerpos lúteos en todas las alpacas de los GEs e impedir la gestación a partir de embriones no recuperados.

#### **3.3.4. Búsqueda y clasificación de embriones**

La búsqueda de embriones en el medio de lavado contenido en las placas petri cuadrículadas conservadas en platina caliente se hizo con un estereomicroscopio Nikon® a 40X y siguiendo un orden en cada cuadrícula. La clasificación de embriones de camélidos se basó en la propuesta de Tibary *et al.* (2015):

- Grado I: Embriones de calidad excelente, caracterizado por blastocisto eclosionado, con forma casi perfectamente esférico, sin irregularidades y ausencia de estructuras en el citoplasma. Embriones entre el día 7 y 8.
- Grado II: Embriones de calidad bueno, caracterizado por algunas irregularidades con muy pocas células extruidas.
- Grado III: Embriones de calidad media o regular, caracterizada por ser pequeña con parches oscuros, de forma irregular y con células extruidas.
- Grado IV: Embriones de calidad mala, caracterizada por blastocistos colapsados, contorno irregular con áreas oscuras y áreas claras o desgarradas.
- Grado V: Embriones no transferibles, con blastocistos muy oscuros colapsados, todas las etapas del desarrollo embrionario todavía con zona pelúcida (no eclosionado).

La clasificación de embriones de alpacas colectadas en el presente trabajo, consideró cuatro calidades: excelente, bueno, regular y mala. La calidad mala (o grado IV) incluyó a los embriones no transferibles o embriones del grado V.

La clasificación de embriones según el grado de desarrollo embrionario fue tomando en consideración a la propuesta de Palma (2001) para embriones bovinos, donde el estadio de mórula se caracterizó con embriones conteniendo blastómeros unidos, ocupando casi todo el espacio perivitelino y con zona pelúcida; mientras que el blastocisto eclosionado o protruido, se caracterizó cuando el embrión abandonó la zona pelúcida y con blastocele bien definido o colapsado.

Para el presente trabajo, se consideraron embriones transferibles a la agrupación de embriones excelentes y buenos, así como embriones no transferibles a aquellos de calidad regular y mala.

### **3.4. Análisis de datos**

Los datos se presentan en cuadros mediante promedios  $\pm$  desviación estándar (Prom.  $\pm$  D.E.), mínimos y máximos, así como porcentajes. Por el tamaño de muestra ( $n < 50$ ), los datos de las variables estudiadas fueron sometidos a la prueba de Shapiro-Wilk para determinar su distribución normal (Anexo 3A). Los datos fueron analizados mediante el

paquete estadístico IBM® SPSS® Statistics (versión 22.0). Las diferencias se consideraron significativas cuando  $p < 0.05$ .

El tamaño de folículos inducidos a la ovulación en la superovulación (día 00), número de folículos  $\geq 3$  mm y  $< 7$  mm, número total de embriones, tamaño de folículos luteinizados y número de folículos anovulatorios al día 14 del protocolo superovulatorio con eCG, fueron comparados mediante la prueba de hipótesis no paramétrica de Mann-Whitney (Anexo 4A).

El número de folículos  $\geq 3$  mm de diámetro al día 1.5 (36 h), número y tamaño de folículos preovulatorios ( $\geq 7$  mm) al día 7.5, así como, el número de cuerpos lúteos, número de folículos luteinizados y tamaño de folículos anovulatorios al día 14 del programa superovulatorio, fueron comparados entre los GEs mediante la prueba de hipótesis paramétrica t de student para muestras independientes (Anexo 5A).

El número de alpacas con y sin colección embrionaria (Anexo 6A) así como la comparación de embriones transferibles y no transferibles (Anexo 9A) entre GEs, fueron comparados mediante la prueba de chi cuadrado con corrección de continuidad.

La comparación del número de alpacas superestimuladas con eCG según el número de embriones colectados (Anexo 7A), el número de embriones colectados según calidad (excelente, bueno, regular y malo) y el porcentaje de embriones colectados según el grado de desarrollo (blastocistos, mórulas y ovocitos sin fecundar) (Anexo 10A) entre GEs, fueron comparados mediante la prueba exacta de Fisher y la diferencia múltiple de proporciones.

Complementariamente, el número de folículos emergentes  $\geq 3$  mm en la primera, segunda y tercera onda folicular consecutiva fueron comparados mediante la prueba de Mann-Whitney entre GEs (Anexo 11A).

## IV. RESULTADOS

### 4.1. Respuesta superovulatoria con eCG en alpacas según el número de folículos emergentes en la onda folicular

El cuadro 1 muestra la respuesta ovárica de alpacas al protocolo de superovulación con eCG según los grupos experimentales.

Las alpacas iniciaron el protocolo superovulatorio (Día 0) en presencia de folículos preovulatorios con tamaños similares ( $p = 0.17$ ) con Promedio  $\pm$  D.E. de  $9.3 \pm 2.2$  mm (7.2 mm a 14.0 mm) en GE01 y con  $8.6 \pm 1.1$  mm (7.2 mm a 11.0 mm) en GE02 (Anexo 4A), registrándose el 100% de las ovulaciones con dosis de 0.0042 mg de acetato de buserelina.

A las 36 horas (Día 1.5) de inducida la ovulación del folículo preovulatorio y previa a la aplicación del estímulo superovulatorio con eCG, la cantidad de folículos  $\geq 3$  mm fueron registradas en similares cantidades ( $p = 0.66$ ) tanto en GE01 ( $2.7 \pm 0.8$  folículos) como en GE02 ( $2.6 \pm 1.3$  folículos) (Anexo 5A).

Al día 7.5 de iniciado el protocolo supeovulatorio y como efecto de la eCG, ambos GEs mostraron similares cantidades de folículos  $\geq 3$  mm y  $< 7$  mm de diámetro ( $p = 0.96$ , anexo

4A), así mismo, cada GE presentó una alpaca con valores atípicos en el número de folículos  $\geq 3$  mm y  $< 7$  mm de diámetro (Figura 6A).

Cuadro 1. Respuesta ovárica a la superovulación con eCG en alpacas según grupos experimentales

Respuesta ovárica al tratamiento superovulatorio con eCG	Grupo Experimental 01 ( $\leq 03$ Fol. $\geq 3$ mm)		Grupo Experimental 02 ( $\geq 04$ Fol. $\geq 3$ mm)	
	n	Prom. $\pm$ D.E	n	Prom. $\pm$ D.E
Día 0, Inicio de la superovulación				
Diámetro de folículo preovulatorio inducido a la ovulación (mm)	15/15	9.3 <sup>a</sup> $\pm$ 2.2	11/11	8.6 <sup>a</sup> $\pm$ 1.1
Día 1.5 (36 horas), previa aplicación de eCG				
N° de folículos $\geq 3$ mm de diámetro	13/15	2.7 <sup>a</sup> $\pm$ 0.8 (35)	09/11	2.6 <sup>a</sup> $\pm$ 1.3 (23)
Efecto de la eCG				
Día 7.5, previo al empadre				
N° de folículos $\geq 3$ mm y $< 7$ mm*	14/15	4.4 <sup>a</sup> $\pm$ 4.0 (61)	09/11	4.67 <sup>a</sup> $\pm$ 3.7 (42)
Folículos preovulatorios ( $\geq 7$ mm)				
Cantidad (N°)	15/15	7.5 <sup>a</sup> $\pm$ 3.7 (112)	11/11	10.1 <sup>a</sup> $\pm$ 6.3 (111)
Tamaño (mm)	15/15	8.4 <sup>a</sup> $\pm$ 1.1	11/11	8.8 <sup>a</sup> $\pm$ 0.9
Total de folículos $\geq 3$ mm* (N°)	15/15	11.5 <sup>a</sup> $\pm$ 5.9 (173)	11/11	13.9 <sup>a</sup> $\pm$ 8.6 (153)
Día 14, recuperación embrionaria				
Cuerpos Lúteos				
Cantidad (N°)	15/15	7.2 <sup>a</sup> $\pm$ 3.3 (108)	11/11	8.6 <sup>a</sup> $\pm$ 5.0 (102)
Diámetro (mm)	15/15	10.7 <sup>a</sup> $\pm$ 1.2	11/11	11.4 <sup>a</sup> $\pm$ 2.5
Folículos anovulatorios luteinizados* $\geq 11$ mm				
Cantidad (N°)	5/15	1.6 <sup>a</sup> $\pm$ 0.5 (8)	4/11	2.8 <sup>a</sup> $\pm$ 1.3 (14)
Tamaño (mm)	5/15	14.5 <sup>a</sup> $\pm$ 6.3	4/11	16.3 <sup>a</sup> $\pm$ 2.7
Folículos anovulatorios* $\geq 12$ mm				
Cantidad (N°)	7/15	2.0 <sup>a</sup> $\pm$ 1.0 (14)	7/11	2.0 <sup>a</sup> $\pm$ 2.2 (14)
Tamaño (mm)	7/15	16.4 <sup>a</sup> $\pm$ 5.8	7/11	18.4 <sup>a</sup> $\pm$ 4.2

Letras distintas en la misma fila indican diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) mediante al prueba de hipótesis t de student y la prueba de Mann-Whitney\*.

n = cantidad de animales

( ) Total de estructuras por Grupo Experimental

Con respecto al número de folículos preovulatorios  $\geq 7$  mm, tanto en GE01 ( $7.5 \pm 3.7$  folículos) y GE02 ( $10.1 \pm 6.3$  folículos), estos no difirieron entre sí ( $p = 0.20$ , anexo 5A). El número de folículos preovulatorios ( $\geq 7$  mm) en las alpacas del GE01 no se encuentran muy dispersos de su mediana ( $Me_1 = 7$ ) (Figura 7A), sin embargo se observa en este grupo a una alpaca con un valor atípico leve con 16 folículos preovulatorios. En GE02, se observa que

entre el cuartil 2 y 3 ( $Q3-Q2 = 9$ ) se concentra la mayor dispersión de alpacas que contienen de 8 a 17 folículos preovulatorios con respecto a su valor mediano ( $Me_2 = 8$ ) (Figura 7A).

Al día 14, previa a la colección intrauterina de embriones, las alpacas de los GEs tuvieron similares cantidades en número ( $p = 0.22$ ) y tamaño de cuerpos lúteos ( $p = 0.37$ ) (Anexo 5A). Así mismo, las alpacas de ambos GEs tuvieron similar predisposición a formar folículos anovulatorios luteinizados en tamaño ( $p = 0.12$ , anexo 4A) y número ( $p = 0.09$ , anexo 5A) y, así como folículos anovulatorios en número ( $p = 0.35$ , anexo 4A) y tamaño ( $p = 0.48$ , anexo 5A) (Figura 8A).

#### 4.2. Producción embrionaria con eCG en alpacas según el número de folículos emergentes de la onda folicular

El cuadro 2 describe el número y la proporción de alpacas con colección embrionaria, así como el número promedio de embriones colectados por alpaca, según GEs. En GE02, una alpaca fue retirada de la colección embrionaria por presentar una infección uterina (piometra) y no fue incluida en el análisis. La colección embrionaria no fue posible en 20% y 30% de alpacas en GE01 y GE02, respectivamente ( $p = 0.92$ , anexo 6A); así mismo, el promedio de embriones colectados fue similar en ambos GEs ( $p = 0.79$ , anexo 4A).

Cuadro 2. Alpacas con colección embrionaria y promedio de embriones colectados, según grupo experimental en alpacas estimuladas con eCG

GEs	Alpacas					Colección embrionaria			
	Total	Sin colección		Con colección		Prom. $\pm$ D.E.	Mín.	Máx.	Total de embriones
		Cant.	%	Cant.	%				
GE01	15	3 <sup>a</sup>	20.0	12 <sup>a</sup>	80.0	2.5 <sup>a</sup> $\pm$ 1.4	1	5	30
GE02	10	3 <sup>a</sup>	30.0	7 <sup>a</sup>	70.0	2.3 <sup>a</sup> $\pm$ 1.1	1	4	16
Total	25	6	24.0	19	76.0	2.4 $\pm$ 1.3	1	5	46

Letras distintas en la misma columna indican diferencia ( $p < 0.05$ ) a la prueba de chi cuadrado con corrección de continuidad para alpacas con o sin colección y t de student para el promedio de embriones

En el cuadro 3, ambos GEs mostraron igual número y proporción ( $p = 1.0$ ) de alpacas superestimulados con eCG según el número de embriones colectados por grupo experimental (Anexo 7A).



Cuadro 3. Alpacas superestimuladas con eCG según el número de embriones colectados y por grupo experimental

Grupos experimentales	Alpacas con embriones colectados								Total	
	Un embrión		Dos embriones		Tres embriones		4 y 5 embriones			
	Cant.	%	Cant.	%	Cant.	%	Cant.	%	Cant.	%
GE01	4 <sup>a</sup>	33.3	2 <sup>a</sup>	16.7	3 <sup>a</sup>	25.0	3 <sup>a</sup>	25.0	12	100.0
GE02	2 <sup>a</sup>	28.6	2 <sup>a</sup>	28.6	2 <sup>a</sup>	28.6	1 <sup>a</sup>	14.3	7	100.0

Letras distintas en la misma columna indican diferencia ( $p < 0.05$ ) a la prueba exacta de Fisher.

En el cuadro 4, la calidad de embriones colectados de alpacas superestimuladas con eCG fueron diferentes en la calidad regular y similares en la calidad excelente, bueno y malo, entre ambos GEs ( $p = 0.09$ ) (Anexo 8A).

Cuadro 4. Calidad de embriones colectados en alpacas superestimuladas con eCG, según grupos experimentales

Grupos experimentales	Calidad embrionaria								Total	
	Excelente (E)		Bueno (B)		Regular (R)		Malo (M)			
	Cant.	%	Cant.	%	Cant.	%	Cant.	%	Cant.	%
GE01	19 <sup>a</sup>	63.3	6 <sup>a</sup>	20.0	2 <sup>a</sup>	6.7	3 <sup>a</sup>	10.0	30	100.0
GE02	7 <sup>a</sup>	43.8	1 <sup>a</sup>	6.3	5 <sup>b</sup>	31.3	3 <sup>a</sup>	18.8	16	100.0
Total	26	56.5	11	15.2	7	15.2	6	13.0	46	100.0

Letras distintas en la misma columna indican diferencia ( $p < 0.05$ ) a la prueba exacta de Fisher

El cuadro 5 muestra el número de embriones transferibles (excelentes y buenos) y no transferibles (regulares y malos) en cantidades similares entre ambos GEs ( $p = 0.77$ ) a la superestimulación ovárica con eCG (Anexo 9A).

En el cuadro 6, se presenta el número de embriones recolectados en estado de blastocisto y mórula, así como el número de ovocitos no fecundados en alpacas superestimuladas según GEs, las mismas que no se diferenciaron entre sí ( $p = 0.41$ ) (Anexo 10A).

Cuadro 5. Colección de embriones transferibles y no transferibles en alpacas superestimuladas con eCG, según grupos experimentales

Grupos experimentales	N	Colección embrionaria				Total	
		Transferibles		No transferibles*			
		Cantidad	%	Cantidad	%	Cantidad	%
GE01	15	25 <sup>a</sup>	83.3	5 <sup>a</sup>	16.7	30	100.0
GE02	10	12 <sup>a</sup>	75.0	4 <sup>a</sup>	25.0	16	100.0
Total	25	37	80.4	9	19.6	46	100.0

Letras distintas en la misma columna indican diferencia ( $p < 0.05$ ) a la prueba de chi cuadrada con corrección de continuidad.

n = Cantidad de alpacas

(\*) No incluye ONF (ovocitos no fecundados)

Cuadro 6. Grado de desarrollo de embriones colectados en alpacas superestimuladas de eCG, según grupo experimental

Grupos experimentales	Desarrollo embrionario						Total de embriones	
	Blastocistos (Bl)		Mórulas (Mo)		Ovocitos no fecundados (ONF)			
	Cant.	%	Cant.	%	Cant.	%	Cant.	%
GE01	28 <sup>a</sup>	90.3	2 <sup>a</sup>	6.5	1 <sup>a</sup>	3.2	31	100.0
GE02	13 <sup>a</sup>	76.5	3 <sup>a</sup>	17.6	1 <sup>a</sup>	5.9	17	100.0
Total	41	85.4	5	10.4	2	4.2	48	100.0

Letras distintas en la misma columna indican diferencia ( $p < 0.05$ ) a la prueba exacta de Fisher.

#### 4.3. Folículos emergentes en ondas foliculares consecutivas según grupos experimentales

En el cuadro 7, se muestran los datos complementarios al presente estudio, donde el número de folículos emergentes  $\geq 3$  mm de diámetro, se mantienen en cantidades similares al GE01 durante ondas foliculares sucesivas. Sin embargo, dicho número a pesar de la diferencias estadísticas en la primera onda folicular entre grupos experimentales ( $p = 0.000$ ), éste se reduce en el GE02 a cifras similares al GE01 en la segunda ( $p = 0.20$ ) y tercera onda folicular ( $p = 0.15$ ) (Anexo 11A).

Cuadro 7. Número de folículos emergentes  $\geq 3$  mm de diámetro durante tres ondas foliculares según grupo experimental

Onda folicular	Grupo Experimental 01					Grupo Experimental 02				Total		
	N	Prom. $\pm$ D.E.	Mín.	Máx.	n	Prom. $\pm$ D.E.	Mín.	Máx.	N	Prom. $\pm$ D.E.	Mín.	Máx.
1ra. Onda	15	2.3 <sup>a</sup> $\pm$ 0.5	2	3	11	5.1 <sup>b</sup> $\pm$ 1.8	4	9	26	3.5 $\pm$ 1.8	2	9
2da. Onda	15	2.8 <sup>a</sup> $\pm$ 1.1	1	4	11	3.5 <sup>a</sup> $\pm$ 1.4	2	6	26	3.1 $\pm$ 1.3	1	6
3ra. Onda	15	2.3 <sup>a</sup> $\pm$ 1.5	1	6	11	3.1 <sup>a</sup> $\pm$ 1.6	1	6	26	2.6 $\pm$ 1.6	1	6

Letras distintas en la misma fila indican diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) a la prueba de hipótesis de Mann-Whitney

N, n = número de animales

## V. DISCUSIÓN

### 5.1. Respuesta superovulatoria con eCG en alpacas según el número de folículos emergentes en la onda folicular

La respuesta superovulatoria a la eCG en alpacas en función al promedio de folículos preovulatorios ( $\geq 7$  mm) y cuerpos lúteos, fueron similares a lo observado en el GE02 ( $10.1 \pm 6.3$  folículos y  $8.6 \pm 5.0$  CLs) y ligeramente superiores a GE01 ( $7.5 \pm 3.7$  folículos y  $7.2 \pm 3.3$  CLs) respecto a los resultados obtenidos por Mendoza (2012) ( $10.2 \pm 4.47$  folículos y  $8.0 \pm 3.42$  CLs) usando 700 UI de eCG, así como también a los resultados de Huanca (2008) ( $9.74 \pm 1.27$  folículos de 7 a 13 mm y  $9.92 \pm 0.99$  CLs) usando 750 UI de eCG.

La diferencia significativa en el número de folículos  $\geq 3$  mm al inicio de la primera onda folicular (GE01:  $\leq 3$  folículos, GE02:  $\geq 4$  folículos) tuvo similar número de folículos antrales (folículos entre  $\geq 3$  mm y  $< 7$  mm y folículos preovulatorios  $\geq 7$  mm) al día 7.5 como respuesta a la aplicación de la eCG, contrastando con los hallazgos de Singh *et al.* (2004), quienes encontraron una mayor respuesta gonadotrópica (FSH) de mayor número de folículos antrales en vacas con mayor número de folículos  $\geq 2$  mm a la aparición de las ondas. El

estrecho rango en el número de folículos  $\geq 3$  mm a la emergencia de la primera onda folicular (entre 2 a 9 folículos) afectó directamente en la conformación de los GEs e imposibilitaron la agrupación de las alpacas en función al número extremo de folículos emergentes (Ej. 10% superior y 10% inferior) tal como Singh *et al.* (2004) lo hicieran para predecir significativamente la respuesta superestimuladora. Así mismo, a pesar que el número de folículos emergentes antrales al inicio de la onda folicular varíe entre ondas consecutivas, como ocurrió en el presente estudio donde los grupos GE01 y GE02 mostraron diferencia significativa en la primera onda folicular, estos fueron similares en la 2da y 3ra onda folicular. Por lo tanto, es probable que en alpacas existan otros factores no conocidos que no permiten una predicción más certera y que el número de folículos  $\geq 3$  mm (GE01:  $\leq 3$  folículos, GE02:  $\geq 4$  folículos) parece no ser el único factor a considerar.

La menor cantidad de folículos emergentes al inicio de la onda folicular en alpacas también fue caracterizado ecográficamente por Vaughan *et al.* (2004) en condiciones diferentes al de los Andes peruanos con el crecimiento de 1 a 3 folículos de 3 a 5 mm de un grupo inicial de 8 a 10 folículos menores a 3 mm de diámetro y por Vásquez (2018) en el Perú desde 1 a 8 folículos  $\geq 3$  mm de diámetro (Prom  $\pm$  D.E:  $2.8 \pm 1.3$  folículos). Estas cantidades reportadas en alpacas aún son mucho menores al compararse con otras especies, como el caso de los bovinos con 8 a 41 folículos de 3 a 4 mm reportados por Pierson y Ginther (1987) y en dromedarios ( $n = 12$ ) con  $12.77 \pm 0.93$  folículos  $\geq 3$  mm reclutados por onda (rango 8-34 folículos) descritos por Manjunatha *et al.* (2012). Estos antecedentes confirman que las alpacas tienen un estrecho rango y menor número de folículos  $\geq 3$  mm al inicio de una nueva onda folicular tras la inducción ovulación de un folículo  $\geq 7$  mm de diámetro, hecho que al parecer es una característica inherente a la especie.

La onda folicular en alpacas se desarrolla de manera cíclica (Bravo y Sumar, 1989) y como lo manifiestan Bravo *et al.* (1990), su surgimiento se da a los dos o tres días de haberse iniciado la regresión del folículo dominante (FD) en caso de ondas foliculares no ovulatorias. Este hecho hace suponer la existencia de algún mecanismo que posibilite la emergencia folicular momentos previos a la retrocesión del FD o inmediatamente después de ocurrida la ovulación, cuyo tiempo demandó según Andrade (2007) en  $4.3 \pm 1.4$  días desde la aplicación

de un análogo de GnRH (acetato de buserelina). En otras especies, Aba (2014) indica que el reclutamiento folicular en ovejas necesita de niveles basales de gonadotropinas, mientras que el inicio del reclutamiento folicular en los bovinos requiere de una oleada secundaria de FSH posterior al proceso ovulatorio, evidenciando una relación entre la FSH y la aparición de la onda folicular; y en llamas hasta el momento no se ha encontrado una correlación temporal entre la secreción de FSH y el desarrollo de folículos, por lo que sugiere establecer métodos más sensibles para medir la FSH en esta especie. En consecuencia, aún queda por dilucidarse los mecanismos involucrados que posibiliten el reclutamiento inicial y el reclutamiento cíclico continuo en los camélidos sudamericanos.

Así mismo, en alpacas aún no están claros los tamaños de los folículos emergentes en la onda folicular a partir de los cuales se hacen sensibles a las gonadotropinas como lo está determinada en porcinos (1 mm), ovinos (2 mm), vacunos (3 a 5 mm) y equinos (10 mm) (Monniaux *et al.*, 1997). Recientemente, Céliz (2017) en un estudio en alpacas (n = 35) determinó por histología el recuento de folículos antrales a partir de ovarios procedentes de matadero, resultando entre 6 y 32 folículos/ovario. Por lo tanto, para continuar comprendiendo la fisiología ovárica afin de determinar la sensibilidad de los folículos a las gonadotropinas en el inicio de la onda folicular en alpacas y reajustarse el tiempo de inicio del protocolo superovulatorio, urge el uso de técnicas más sensibles y herramientas diagnósticas como el seguimiento ecográfico con transductores de poca profundidad pero de alta resolución (Carrière *et al.*, 2005) como los transductores de 7.5 MHz recomendados para el estudio de la dinámica folicular (Ribadu y Nakao, 1999) al cual se incluyan folículos  $\geq 2$  mm (o hasta otros de menor diámetro), que son factibles en alpacas como lo indicaron Pacheco *et al* (2017). Anteriormente, un hecho similar fue reportado en bovinos por Evans *et al.* (2011) donde la variabilidad de folículos durante la emergencia y su repetibilidad no fue detectada hasta incluirse en su estudio, folículos menores que 5 o 6 mm de diámetro.

La presencia similar de folículos  $\geq 3$  mm en ambos GEs (GE01:  $2.7 \pm 0.8$  y GE02:  $2.6 \pm 1.3$  folículos) previas a la administración de la eCG (D 1.5), no tienen mucha relación con el número de folículos al día 7.5; lo que haría suponer que el inicio de la onda folicular y el tamaño folicular sensible a gonadotropinas aún no están claros en las alpacas. Probablemente

los folículos  $\geq 3$  mm, previas a la aplicación de la eCG, podrían haber formado parte de los folículos que iniciaron (junto a otros) a desarrollarse por el efecto inmediato de la eCG tras la liberación del efecto supresor del folículo dominante o fueron las que regresionaron para dar inicio con el crecimiento de una nueva cohorte de folículos. Al respecto, durante la foliculogénesis, el crecimiento de folículos primarios y secundarios (folículos preantrales) no dependen de las gonadotropinas y están mediadas por factores intraováricos así como vías de señalización; sin embargo, otros estudios indicarían que la transición de folículo preantral a folículo antral temprano podrían estar mediadas por las gonadotropinas por la presencia de receptores para la LH en las células de la teca y receptores para la FSH en las células de la granulosa (Hannon y Curry, 2018) y no se descartaría la mediación de la eCG en esta transición por sus efectos biológicos similares a la FSH y LH (Martinuk *et al.*, 1991). Las hormonas superovulatorias se usan con la finalidad de incrementar el número de folículos reclutados en el inicio de la onda folicular, respuesta que se ve mejorada en camellos (Tibary y Anouassi, 1997; Tibary *et al.*, 2007), cuando el proceso se inicia en ausencia de folículos  $> 2$  mm.

Aunque el número de folículos superestimulados  $\geq 7$  mm de las alpacas del GE01 ( $7.5 \pm 3.7$ ) es aparentemente menor al GE02 ( $10.1 \pm 6.3$ ), el promedio pudo haberse afectado con la presencia de un valor atípico en el número de folículos superestimulados de una alpaca (16 folículos) (Figura 7A) registrado al día 7.5 de iniciado el programa superestimulador con eCG.

Alpacas de ambos GEs (GE01:  $\leq 3$  folículos, GE02:  $\geq 4$  folículos) han tenido la predisposición de formar folículos anovulatorios y folículos anovulatorios luteinizados. La formación de estas estructuras ováricas, al parecer no estarían relacionados con la dosis de eCG usadas, en vista que las mismas se han reportado con dosis de 650 UI (Cervantes, 2008) o 1000 UI (Vivanco *et al.*, 2014a). La ventaja del uso de la eCG en comparación a otra gonadotropina (FSH) es su bajo costo y la dosis única requerida para lograr una respuesta ovárica superovulatoria; sin embargo, se corre el riesgo de obtener un sobrecrecimiento de los folículos posterior a la ovulación, incrementos en el nivel de estrógenos y efectos negativos en el tracto reproductivo de la hembra y colección embrionaria (Roche e Ireland, 1984). La presencia de folículos anovulatorios o luteinizados obedecen a las fallas de la

ovulación, causas descritas por Rodriguez *et al.* (2014) como una inadecuada liberación de la hormona luteinizante o insuficientes para ovarios superestimulados, folículos grandes que iniciaron con su regresión y terminan luteinizándose, así como folículos que aún no han adquirido su capacidad para responder a la LH; supuestos que tendrían relación con la cantidad de folículos entre 3 mm y 7 mm observados antes del empadre en ambos GEs y que continuaron bajo el efecto de la vida media larga de la eCG determinado por la subunidad beta de su constitución molecular y su alto contenido en ácido siálico descritos por Schams *et al.* (1978).

## **5.2. Producción embrionaria con eCG en alpacas según el número de folículos emergentes en la onda folicular**

La similitud del porcentaje de alpacas de los que no fueron posible la colección embrionaria en el programa de superestimulación con eCG en los GEs (GE01 = 20%, GE02 = 30%) fueron menores en comparación a los reportes de Vaughan *et al.* (2013) quienes a través de un estudio retrospectivo informaron no haber recuperado ningún embrión en 33.5% (548/1736) de alpacas superestimuladas en Australia.

De otro lado, la cantidad media de embriones colectados en ambos GEs (GE01:  $2.5 \pm 1.4$ ; GE02:  $2.3 \pm 1.1$  embriones) fueron ligeramente superiores a los reportados por Huanca (2008) con  $1.6 \pm 0.3$  embriones usando 750 UI de eCG e inferiores a los reportados por Cervantes (2008) con  $4.3 \pm 0.39$  embriones usando 650 UI de eCG y a los de Vivanco (2013) con  $3.52 \pm 3.01$  (año 2010),  $4.18 \pm 2.28$  y  $3.69 \pm 3.42$  (año 2013) embriones con 1000 UI de eCG. Alpacas con un embrión colectado en GE01 (33.3%) y GE02 (28.6%) o mayor a dos embriones en ambos GEs (GE01: 66.7%; GE02: 71.4%) fueron superiores a los reportados por Vaughan *et al.* (2013) con 16.4% (268/1636) y 50.1% (820/1636), respectivamente.

Con respecto a la proporción de alpacas con colección embrionaria así como la cantidad de embriones, estos dependen de la presencia o ausencia de los mismos a nivel del útero, cuyo descenso ocurre posterior a la ovulación y la fecundación como lo manifiesta Sumar y Picha (2014); así mismo, dependen de varios factores propios del animal y de factores externos. Entre los factores intrínsecos que pudieron afectar la tasa de recuperación embrionaria están la función de la bolsa ovárica durante la ovocaptación de un ovario



superestimulado que es de mayor tamaño en comparación a un ovario en condiciones fisiológicas (Taylor *et al.*, 2001; Novoa *et al.*, 1999). Otros factores como la luteinización folicular y alteraciones durante la ovulación debido a la vida media larga de la eCG referida por Tibary *et al.* (2015), así como la presencia de folículos grandes al día de la colección que se asocia negativamente ( $r = -0.26$ ) con la cantidad de embriones recuperados (Vivanco *et al.*, 2014a) porque alteran el transporte de gametos o los procesos de la fecundación (Anouassi y Tibary, 2013) ante la posibilidad de ser recuperados desde el día 6 desde los cuernos uterinos (Cervantes *et al.*, 2011); finalmente, y en menor grado, el medio y la técnica de colección embrionaria (Bourke *et al.*, 1995a; Ratto *et al.*, 1999; Huanca *et al.*, 2006) en vista que el sistema discontinuo empleado para la colección embrionaria no siempre coincidió entre las cantidades infundidas y recuperadas durante el lavado intrauterino.

La similitud de embriones transferibles colectados entre los GEs (GE01 = 83.3%, GE02 = 75.0%) fueron mayores en comparación a los de Mendoza (2012) con 61% (11/18). La diferencia de embriones de calidad regular o la similitud de embriones de calidad excelente, bueno y malo entre GEs, también están influenciados por factores externos e internos. Entre los factores externos podemos mencionar a las técnicas en la colección o los medios de lavado utilizados (Huanca *et al.*, 2006), calidad espermática, la pericia o la experiencia del recolector (Reyna, 2006) y la variabilidad entre lotes de la eCG (Villaraza, 2016); y como los factores internos están la calidad de los ovocitos que forman parte de la onda folicular que son perturbados en su desarrollo normal producto de una superestimulación ovárica, dando lugar a ovocitos con calidad reducida (Krisher, 2004) y el reinicio precoz de la meiosis por la actividad LH de la eCG, ocasionándose aneuploidia así como problemas en el desarrollo temprano del embrión como los reportados por Monniaux *et al.* (1984). La importancia de la calidad embrionaria influye en la tasa de las transferencias exitosas como lo demostraron Vaughan *et al.* (2013), al obtener mayor cantidad de crías con la transferencia de embriones de grado 1 y 2 en comparación al uso de embriones de grado 3 y grado 4.

Los embriones colectados en los GEs según grado de desarrollo fueron inferiores a los 88.9 % (16/18) de blastocistos reportados por Mendoza (2012). La presencia de mórulas obedecería a la ocurrencia de las ovulaciones tardías (Reyna, 2006) que conllevarían de la

misma manera a fecundaciones tardías y por ende, menor grado de desarrollo de los embriones (o la misma presencia de ovocitos sin fecundación) que desembocan en el útero. La superestimulación ovárica genera el desarrollo de diversos tamaños de folículos en los ovarios, generando embriones de diferente grado de desarrollo en el día de la colecta, así mismo, se compromete la calidad del ovocito (maduración) y la sobrevivencia del embrión (Aba, 2014). El embrión en su última transición por el oviducto en dirección al útero lo hace mayormente en etapa de blastocisto eclosionado (Bourke *et al.*, 1991) y son sometidos a un delicado proceso de selección propia de la especie, función probablemente atribuida a la unión útero tubárica, reteniéndose embriones no competentes (Novoa *et al.*, 1999). Un embrión eclosionado al no poseer la zona pelúcida es más sensible al daño en su tránsito por el oviducto o a la acción mecánica en el lavado durante la colección embrionaria (Novoa *et al.*, 1999), lo que explicaría en parte la presencia de *detritus* contenidos en los lavados intrauterinos. Así mismo, la estimulación artificial del ovario, conlleva a que se incluyan ciertos folículos con ovocitos anormales que influirán en la fecundación o desarrollo embrionario (Sirard *et al.*, 2000) afectando la respuesta ovárica y embrionaria posterior.

La diferencia significativa en el número de folículos  $\geq 3$  mm al inicio de la primera onda folicular (GE01:  $\leq 3$  folículos, GE02:  $\geq 4$  folículos) tampoco repercutió al día 14 como respuesta al programa de superestimulación con eCG en el número de embriones colectados (GE01 =  $2.5 \pm 1.4$ , GE02 =  $2.3 \pm 1.1$  embriones); el porcentaje de embriones transferibles (GE01 = 83.3 %, GE02 = 75 %), nivel de desarrollo embrionario como blastocistos (GE01 = 90.3 %, GE02 = 76.5 %) y mórulas (GE01 = 6.5 %, GE02 = 17.6 %) y en calidad embrionaria excelente (GE01 = 63.3 %, GE02 = 43.8 %), bueno (GE01 = 20.0 %, GE02 = 6.3 %) y malo (GE01 = 10.0 %, GE02 = 18.8 %) a excepción de la proporción de embriones regulares (GE01 = 6.7 %, GE02 = 31.3 %).

### **5.3. Folículos emergentes en ondas foliculares consecutivas según grupos experimentales**

Resultados adicionales a nuestro estudio (Cuadro 7), indican la poca sostenibilidad del número de folículos emergentes  $\geq 3$ mm en GE02, los cuales se redujeron a similares

cantidades al del GE01 en la segunda y tercera onda folicular. Sospechamos que esta reducción podría estar atribuida, a los efectos del estrés ocasionado a las alpacas por la manipulación inter diaria al examen ecográfico por largos periodos de tiempo (hasta inicios de la tercera onda), donde las alpacas del GE02 fueron las más afectadas. Entre otros factores estresantes como una mala condición corporal o temperaturas adversas, resaltamos los procedimientos del manejo que tienen efectos sobre el control de la secreción pulsátil de la GnRH/LH mediados por el hipotálamo específicamente el área preóptica (POA), diferentes partes del hipotálamo y la eminencia media (EM) (Dobson *et al.*, 2012). Al respecto, Crossley *et al.* (1994) demostraron que las alpacas sufren estrés adaptativo a nuevas condiciones ambientales, registrando altos niveles de cortisol sanguíneo, sin embargo, se adaptan rápidamente a su nuevo ambiente; así mismo, Franklin (1982) indica también como factores desencadenantes del estrés, a los fenómenos conductuales sociales como al reagrupamiento de animales en nuevos grupos donde se generan un proceso de dominancia. Al parecer, entre los genotipos de alpacas, el suri suele ser el más sensible al estrés por su característica más nerviosa que la alpaca Huacaya.

La reducción del número de folículos emergentes observados en GE02, está poco clara a pesar de que Vásquez (2018) reportó una alta repetibilidad ( $r = 0.72$ ) en alpacas para el número de folículos  $\geq 3$  mm durante el inicio de ondas foliculares sucesivas. Dicha repetibilidad también fue descrita en otras especies animales como por Manjunatha *et al.* (2012) en camellos dromedarios ( $r = 0.95$ ) o en bovinos ( $r = 0.95$ ) según Burns *et al.* (2005). Suponemos que este comportamiento podría estar influenciado por la superposición de las ondas foliculares, donde la duración de la primera onda gobernada por el folículo dominante (FD) (Adams, 2001) así como de su tamaño, sumado al efecto inhibitorio a la GnRH hipotalámica por parte de la progesterona procedente del cuerpo lúteo generado por la inducción de la ovulación de un folículo preovulatorio que dio origen a la primera onda, repercutieron en el inicio de la segunda onda folicular, porque mientras el FD no ovule o regrese, este mantendrá su efecto inhibitorio sobre los demás folículos subordinados o no favorecerá el crecimiento folicular gonadotropina dependiente para el desarrollo de una nueva onda folicular. El efecto inhibitorio del FD sobre los folículos subordinados aún no está claro en las alpacas, pero se postula que podría deberse a la acción de la inhibina y

andrógenos, como sucede en otras especies monovulares como los bovinos (Aba, 2014). Por el contrario, en ondas cíclicas cuando el FD inicia su regresión debido a la ausencia de un factor inductor de la ovulación que en camélidos Ratto *et al.* (2012) ha denominado como la sub unidad  $\beta$  del factor de crecimiento nervioso ( $\beta$ -NGF) presente en el plasma seminal, se anula el efecto inhibitorio hacia el hipotálamo y se percibe inmediatamente la presencia de un folículo de mayor tamaño (futuro folículo dominante) acompañado de otros folículos subordinados de la nueva onda folicular (Vaughan *et al.*, 2004), observándose una coexistencia entre el folículo en retroceso y la otra en crecimiento por varios días, siendo confusos distinguirlos a la ecografía, fenómeno a la que Aba (2014) lo denominó como ondas foliculares superpuestas.

La alta repetibilidad ( $r = 0.72$ ) de folículos emergentes  $\geq 3$  mm encontrada por Vásquez (2018) fue estimada en ondas foliculares sucesivas no ovulatorias, iniciándose con la ovulación de un folículo preovulatorio  $\geq 7$  mm. La presentación de ondas superpuestas en alpacas, pudieron afectar el número de folículos en la fase de emergencia folicular cuantificables por ultrasonografía; por lo que urge dilucidar la repetibilidad en ondas foliculares subsecuentes donde los folículos dominantes sean inducidos a la ovulación. De otro lado, el coeficiente de repetibilidad debe ser considerado con mucha cautela porque tiene un comportamiento muy variable como lo menciona Harper (1994), influido por el tamaño de los caracteres, el rango de la variación de la medida, precisión del instrumento de medición y facilidad de la toma de la medida. Así mismo, se debe considerar que la cohorte de folículos reclutados que incluyen al futuro folículo dominante, todos ellos antrales, en realidad “inician” su desarrollo mucho antes de la conocida onda folicular (Gigli *et al.*, 2006), pues los folículos antrales pequeños de 0.2 mm, al menos en el bovino, requieren 40 días para llegar al estado preovulatorio.

Como el inicio de la segunda onda así como de la tercera onda folicular de las alpacas en estudio, dependieron de la regresión natural de los folículos dominantes, también tuvo que ver la longitud de la duración de las inter ondas foliculares determinada en promedio por Vásquez (2018) en  $16.9 \pm 3.9$  días, característica muy variable entre animales y de baja repetibilidad ( $r = 0.23$ ), aunque algunos investigadores no recomiendan hacer uso del valor

medio, se han estimado rangos que van desde 12 a 22 días (Vaughan *et al.*, 2004) y que a longitudes de intervalo largas, mayor fue el crecimiento del folículo dominante (Adams, 2001) y mayor es la secreción de  $17\beta$  - estradiol (Chaves *et al.*, 2002) y posiblemente inhibina/andrógenos con el subsecuente mayor efecto inhibitorio sobre el crecimiento folicular (Aba, 2014) y su desarrollo en la onda superpuesta.

## VI. CONCLUSIONES

- ✓ La diferencia significativa en el número de folículos ováricos  $\geq 3$  mm al inicio de la primera onda folicular en alpacas (GE01:  $\leq 3$  folículos, GE02:  $\geq 4$  folículos) presentó similar número y tamaño de folículos antrales al día 7.5, así como la cantidad y tamaño de cuerpos lúteos al día 14 como respuesta superestimuladora a la aplicación de eCG.
- ✓ Se determinó una formación de  $2.0 \pm 2.2$  folículos anovulatorios y  $2.8 \pm 1.3$  folículos luteinizados en ambos grupos experimentales.
- ✓ La proporción de alpacas al que se colectó al menos un embrión fue de 76 % en ambos grupos experimentales.
- ✓ El número promedio de embriones colectados, calidad embrionaria (excelente, bueno, malo) y embriones transferibles fueron similares entre ambos grupos experimentales.
- ✓ Adicionalmente, la diferencia significativa del número de folículos  $\geq 3$  mm al inicio de la primera onda folicular (GE01:  $\leq 3$  folículos, GE02:  $\geq 4$  folículos) es insostenible en ondas foliculares sucesivas no ovulatorias, reduciéndose en el grupo GE02.

## VII. BIBLIOGRAFÍA

1. **Aba MA. 2014.** Anatomy and Physiology of reproduction in the female llama and alpaca. En C. Cebra, D. Anderson, A. Tibary, R. Van Saun, L. Johnson (Eds.), Llama and Alpaca Care (140-150). Canadá: Elsevier Inc.
2. **Adams GA. 2001.** Comparative aspects of follicular dynamics in camelids. Rev. Inv. Vet. (Perú). Suplemento 1: 142-147.
3. **Adams GP, Jaiswal R, Singh J, Malhi P. 2008.** Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. Theriogenology,
4. **Adams GP, Sumar J, Ginther OJ. 1990.** Effects of lactational status and reproductive status on ovarian follicular waves in llamas (*Lama glama*). J Reprod Fertil 90(2): 535-545.
5. **Aerts JM, Bols PE. 2010.** Ovarian follicular dynamics: A review with emphasis on the bovine species. Part I: Folliculogenesis and pre-antral follicle development. Reproduction in Domestic Animals, 45(1), 171–179.
6. **Agüero A, Chaves M, Capdeville E, Russo A. 1999.** Superovulación en Llamas: Comparación de 2 tratamientos. II Congreso Mundial sobre Camélidos. Cuzco-Perú.
7. **Aller J, Cancino A, Rebuffi G, Alberio R. 1999.** Inducción de la ovulación en llamas. En: II Congreso Mundial sobre Camélidos. Resumen. p 91. Cusco, Perú.

8. **Aller JF, Rebuffi GE, Cancino AK, Alberio RH. 2002.** Successful transfer of vitrified llama (*Lama glama*) embryos. Anim. Reprod. Sci. 73, 121–127.
9. **Aller JF, Cancino AK, Rebuffi GE, Alberio RH. 2010.** Effect of estradiol benzoate used at the start of a progestagen treatment on superovulatory response and embryo yield in lactating and non-lactating llamas. Anim. Reprod. Sci. 119, 322–328.
10. **Alvarez RH, Natal FLN, Ribela MTCP, De Almeida BE, De Oliveira JE, Bartolini P. 2016.** Physical-chemical and biological characterization of different preparations of equine chorionic gonadotropin. Journal of veterinary science, 17(4), 459-466.
11. **Ancco E, Olivera L. 2013.** Superovulatory response of alpaca suri with two doses of eCG during the breeding season. Spermova. 3:99-100.
12. **Andrade J. 2007.** Métodos de sincronización de la onda folicular en base a GnRH y LH y su efecto en la respuesta ovárica y tasa de preñez en alpacas y llamas. Tesis para optar el grado académico de Magíster en Producción y Reproducción de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
13. **Anouassi A, Tibary A. 2013.** Development of a large commercial camel embryo transfer program: 20 years of scientific research. Animal reproduction science, 136(3), 211-221.
14. **Bahr JM. 2018.** Ovary: ovary, overview. Skinner, MK Eds. In *Encyclopedia of reproduction*. Vol 2. 2<sup>a</sup> ed. United States: Academic Press. p 3-7.
15. **Black JL, Erickson BH. 1968.** Oogenesis and ovarian development in the prenatal pig. Anatomical Record, 161(1), 45–55.
16. **Borwick SC, Rhind SM, McMillen SR, Racey PA. 1997.** Effect of undernutrition of ewes from the time of mating on fetal ovarian development in mid-gestation. Reprod Fertil Dev, 9:711-715.
17. **Bourke DA, Adam CL, Kyle CE. 1991.** Successful pregnancy following non-surgical embryo transfer in llama. Vet. Rec. 128, 68.
18. **Bourke DA, Kyle CE, McEvoy TG, Young P, Adam CL. 1995a.** Superovulatory response to eCG in llamas (*Lama glama*). Theriogenology 44,255–268.



19. **Bourke DA, CE Kyle, TG McEvoy, P Young, CL Adam. 1995b.** Recipient synchronization and embryo transfer in South American Camelids. *Theriogenology* 43: 171.
20. **Bravo W, Fowler M, Stabenfeldt G, Lasley B. 1990.** Ovarian follicular dynamics in the llama. *Biol. Reprod.* 43: 579-585.
21. **Bravo W, Sumar J. 1989.** Laparoscopic examination of the ovarian activity in alpacas. *Anim. Reprod. Sci.* 30: 271-281.
22. **Broer SL, Mol BWJ, Hendriks D, Broekmans FJM. 2009.** The role of antimullerian hormone in prediction of outcome after IVF: comparison with the antral follicle count. *Fertil Steril*, 91:705-714.
23. **Burns DS, Jimenez-Krassel F, Ireland JL, Knight PG, Ireland JJ. 2005.** Numbers of antral follicles during follicular waves in cattle: evidence for high variation among animals, very high repeatability in individuals, and an inverse association with serum follicle-stimulating hormone concentration. *Biol Reprod*, 73: 54-62.
24. **Cárdenas H. 1997.** Desarrollo morfológico, transporte y supervivencia embrionaria en Alpacas. In: Libro Resumen de la 20º Reunión Científica Anual, Asociación Peruana de Producción Animal. Universidad Nacional Agraria de la Selva, Tingo María, Perú.
25. **Carrière P, DesCôteaux L, Durocher J. 2005.** Ultrasonography of the reproductive system of the cow [CD- ROM]. Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, St - Hyacinthe, Québec.
26. **Carretero MI, Miragaya M, Chaves MG, Gambarotta M, Agüero A. 2010.** Embryo production in superstimulated llamas pre-treated to inhibit follicular growth. *Small Ruminant Res.* 88:32-37.
27. **Charbonneau M. 2009.** Système de peuplement dispersé et regroupement dans les sociétés pastorales andines. In *Annales de géographie* (No. 6, pp. 637-658). Armand Colin.

28. **Céliz RH. 2017.** Determinación de la reserva ovárica en alpacas mediante la concentración de hormona Anti-mulleriana (AMH) en el plasma sanguíneo. Tesis para optar el grado de Magíster Scientiae en producción animal de la Universidad Nacional Agraria La Molina.  
<http://repositorio.concytec.gob.pe/handle/CONCYTEC/662>
29. **Cervantes M. 2008.** Momento óptimo post cópula para la recuperación de embriones del útero de alpaca mediante método no quirúrgico. Tesis para optar el Grado Académico de Magíster en Producción y Reproducción animal, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima-Perú.
30. **Cervantes M, Huanca W, Gonzales M, Palomino M, Leyva V. 2011.** Relación entre el día de colección y la recuperación de embriones en alpacas superovuladas. *Revista De Investigaciones Veterinarias Del Perú*, 22(2), 125-132.  
<https://doi.org/10.15381/rivep.v22i2.282>
31. **Chaves MG, Aba M, Agüero A, Egey J, Berestin V, Rutter B. 2002.** Ovarian follicular wave pattern and the effect of exogenous progesterone on follicular activity in non-mated llamas, *Anim Reprod Sci* 69:37-46.
32. **Crossley JC, Marín MP, Ferrando G. y Raggi LA. 1994.** Modificaciones adaptativas de algunas constantes fisiológicas de alpaca (*Lama pacos*) sometidas a cambios de ambiente. *Arch. Zootec.* 43 (163):215-223.
33. **Curran S, Urven L, Ginther OJ. 1997.** Distribution of putative primordial germ cells in equine embryos. *Equine Veterinary Journal Supplement*, 72–76.
34. **Dobson H, Fergani C, Routly JE, Smith RF. 2012.** Effects of stress on reproduction in ewes. *Anim Reprod Sci* 130: 135– 140
35. **Driancourt MA, Thatcher WW, Terequi M, Andriew D. 1991.** Dynamics of ovarian follicular development in cattle during the estrous cycle, early pregnancy and in response to PMSG. *Dom Anim Endocr* 8: 21–37.
36. **Driancourt MA, Reynaud K, Cortvrindt R, Smitz J. 2000.** Roles of KIT and KIT LIGAND in ovarian function. *Rev Reprod.*; 5(3):143-52.

37. **Easton S. 2012.** Practical veterinary diagnostic imaging. 2<sup>a</sup> edic. Oxford: Wiley-Blackwell. 258 p.
38. **El Allali K, El Bousmaki N, Ainani H and V Simonneaux. 2017.** Effect of the camelid's seminal plasma ovulation-inducing factor/ $\beta$ -NGF: a kisspeptin target hypothesis. *Frontiers in veterinary science*, 4, 99.
39. **Erickson BH. 1966.** Development and senescence of the postnatal bovine ovary. *Journal of Animal Science*, 25, 800–805.
40. **Evangelista S, Cordero A, Santiani A, Vásquez M, Cárdenas O, Huanca W. 2009.** Estimulación con gonadotropina coriónica equina (ECG) durante las fases luteal y no luteal sobre la respuesta ovárica y calidad embrionaria en llamas. *Revista De Investigaciones Veterinarias Del Perú*, 20(1), 33-40.  
<https://doi.org/10.15381/rivep.v20i1.528>
41. **Evans ACO, Mossa F, Fair T, Lonergan P, Butler ST, Zielak-Steciwko AE, Smith GW, Jimenez-Krassel F, Folger JK, Ireland JLH and JJ Ireland. 2011.** Causes and consequences of the variation in the number of ovarian follicles in cattle. *Society for reproduction and Fertility Supplement*, 421-429.
42. **Fernández Baca S, Madden D, Novoa C. 1970.** Effect of different mating stimuli on induction of ovulation in the alpaca. *J. Reprod. Fert.* 22: 261-267.
43. **First NL, Leibfried-Rutledge ML, Sirard MA. 1988.** Cytoplasmic control of oocyte maturation and species differences in the development of maturational competence. *Prog. Clin. Biol. Res.* 267:1–46.
44. **Franklin W. 1982.** Biology, ecology and relationship to man of the South American Camelids. In: *Mammalian Biology in South America*. M. A. Mares and H.H. Genoways editors. Pittsburg, Pymatuning lab, of Ecol. And Univ. Pittsburg. 539 pp.
45. **Galloway M, Grogan SM, Wilson T, McNatty KP, Juengel JL, Ritvos O, Davis GH. 2002.** BMP15 mutations and ovarian function. *Mol. Cell. Endocrinol.* 191(1):15-18.
46. **Germana C, Chaquilla O, Santos G, Ferrari M, Krusich C, Kindgard F. 2016.** Estudio socio-económico de los pastores andinos de Perú, Ecuador, Bolivia y Argentina. Abancay: Tipografía EL ALVA SRL. 540 p.
47. **Gigli I, Russo A y Agüero A. 2006.** Consideraciones sobre la dinámica ovárica en equino, bovino y camélidos sudamericanos. *InVet*, 8(1), 183-204.

48. **Ginther OJ, Kastelic JP, Knopf L. 1989.** Composition and characteristics of follicular waves during the bovine estrous cycle. *Anim Reprod Sci*, 20: 187-200.
49. **Gobikrushanth M, Dutra PA, Bruinje TC, Colazo MG, Butler ST & Ambrose DJ. 2017.** Repeatability of antral follicle counts and anti-Müllerian hormone and their associations determined at an unknown stage of follicular growth and an expected day of follicular wave emergence in dairy cows. *Theriogenology*.
50. **Gonzalez A, Wang H, Carruthers TD, Murphy BD, Mapletoft RJ. 1994a.** Increased ovulation rates in PMSG-Stimulated beef heifers treated with a monoclonal PMSG antibody. *Theriogenology*, 41: 1631-1642.
51. **Gonzalez A, Wang H, Carruthers TD, Murphy BD, Mapletoft RJ. 1994b.** Superovulation in the cow with pregnant mare serum gonadotrophin: Effects of dose and antipregnant mare serum gonadotropin serum. *Can Vet J*, 35: 158-162.
52. **González-Mencio F, Manns J and Murphy BD. 1978.** FSH and LH activity of PMSG from mares at different stages of gestation. *Anim. Reprod, Sci.* 1, 137-174.
53. **Hanco EG, Llacsa J, Quispe YM, Pérez MG, Luque N, Perez UH. 2015.** Dinámica folicular ovárica en alpacas de la raza suri (*Vicugna pacos*). *Spermova* 5(1): 51 – 54.
54. **Hannon PR y Curry TE. 2018.** Ovary Development: folliculogenesis. Skinner, MK Eds. In *Encyclopedia of reproduction*. Vol 2. 2<sup>a</sup> ed. United States: Academic Press. p 72-79.
55. **Harper DGC. 1994.** Some comments on the repeatability of measurements. *Ringings & Migration* 15, 84-90.
56. **Hendriks DJ, Mol BW, Bancsi LF, Te Velde ER. Broekmans FJ. 2005.** Antral follicle count in the prediction of poor ovarian response and pregnancy after *in vitro* fertilization: a meta-analysis and comparison with basal follicle-stimulating hormone level. *Fertil Steril*, 83:291-301.
57. **Hendriks DJ, Kwee J, Mol BW, Te Velde ER, Broekmans FJ. 2007.** Ultrasonography as a tool for the prediction of outcome in IVF patients: a comparative meta-analysis of ovarian volume and antral follicle count. *Fertil Steril*, 87:764-775.

58. **Huanca T. 2008.** Efecto de la administración de gonadotropinas exógenas (FSH y eCG) en la respuesta ovárica y la producción de embriones en alpacas (*Vicugna pacos*). Tesis Doctoral Universidad Santiago de Compostela-España. pp 31
59. **Huanca W, Cárdenas O, Olazábal C, Ratto M, Adams G. 2001.** Efecto hormonal y empadre sobre el intervalo a la ovulación en llamas. Rev. Inv. Vet. Suplemento 1: 462-463.
60. **Huanca W, Ratto M, Cordero A, Santiani A, Huanca T, Cárdenas O, Adams GP. 2006.** Respuesta ovárica y transferencia de embriones en alpacas y llamas en la zona altoandina del Perú. Resumen del V Congreso Mundial de Camélidos, Catamarca – Argentina.
61. **Huanca W, Cordero A, Huanca T, Cardenas O, Adams GP, Ratto MH. 2009.** Ovarian response and embryo production in llamas treated with equine chorionic gonadotropin alone or with a progestin-releasing vaginal sponge at the time of follicular wave emergence. Theriogenology 72, 803–808.
62. **Hunter AG, Moor RM. 1987.** Stage dependent effects of inhibiting ribonucleic acids and protein synthesis on meiotic maturation of bovine oocytes *in vitro*. J. Dairy Sci. 70:1646–1651.
63. **Hytell P, Xa KP, Smith S, Greve T. 1986.** Ultrastructure of in vitro oocyte maturation in cattle. J. Reprod. Fertil. 78:615–625.
64. **IBM® SPSS® Statistics (versión 22.0). 2013.**
65. **Ihm JE. 2009.** Development of an in vitro microenvironment for maturing oocytes. Tesis doctoral en Ciencias. École Polytechnique Fédérale de Lausanne. 129 pp.
66. **Ireland JJ, Ward F, Jimenez-Krassel F, Ireland JLH, Smith GW, Lonergan P, Evans ACO. 2007.** Follicle numbers are highly repeatable within individual animals but are inversely correlated with FSH concentrations and the proportion of good-quality embryos after ovarian stimulation in cattle. Hum Reprod 22:1687–1695.
67. **Ireland JJ, Zielak AE, Jimenez-Krassel F, Folger J, Bettgowda A, Scheetz D, Walsh S, Mossa F, Knight PG, Smith GW, Lonergan P, Evans ACO. 2009.** Variation in the ovarian reserve is linked to alterations in intrafollicular oestradiol production and ovarian biomarkers of follicular differentiation and oocyte quality in cattle. Biol Reprod, 80:954-964.

68. **Ireland JLH, Scheetz D, Jimenez-Krassel F, Themmen APN, Ward F, Lonergan P, Smith GW, Perez GI, Evans ACO, Ireland JJ. 2008.** Antral follicle count reliably predicts number of morphologically healthy oocytes and follicles in ovaries of young adult cattle. *Biol Reprod*, 79:1219-1225.
69. **Jimenez-Krassel F, Folger JK, Ireland JL, Smith GW, Hou X, Davis JS, Lonergan P, Evans ACO Ireland JJ. 2009.** Evidence that high variation in ovarian reserves of healthy young adults has a negative impact on the corpus luteum and endometrium during estrous cycles in cattle. *Biology of reproduction*, 80(6), 1272-1281.
70. **Juengel JL, Sawyer HR, Smith PR, Quirke LD, Heath DA, et al. 2002.** Origins of follicular cells and ontogeny of steroidogenesis in ovine fetal ovaries. *Molecular and Cell Endocrinology*, 191, 1–10.
71. **Kastrop PM, Bevers MM, Desetree OHJ, Kruip TAM. 1991.** Protein synthesis and phosphorylation patterns of bovine oocytes matured *in vivo*. *Mol. Reprod. Dev.* 29:271–275.
72. **Kealy J, McAllister H, Graham J. 2011.** Diagnostic radiology and ultrasonography of the dog and cat. 5<sup>a</sup> edic. Missouri: Elseviers Saunders. 589 p.
73. **Krisher RL. 2004.** The effect of oocyte quality on development. *Journal of animal science*, 82(13\_suppl), E14-E23.
74. **Kruip TAM, Cran DG, van Beneden TH, Dieleman SJ. 1983.** Structural changes in bovine oocytes during final maturation *in vivo*. *Gamete Res.* 8:29–47.
75. **Lecompte F, Roy F, Combarnous Y. 1988.** International collaborative calibration of a preparation of equine chorionic gonadotrophin (eCG NZY-01) proposed as a new standard. *J Reprod Fertil*, 113, 145-150.
76. **Lee CK, Scales N, Newton G, Piedrahita JA. 1998.** Isolation and initial characterization of primordial cell (PGC)-derived cells from goats, rabbits and rats. *Theriogenology*, 49, 388, abstract.
77. **Levesque JT, Sirard MA. 1995.** Effects of different kinases and phosphatases on nuclear and cytoplasmic maturation of bovine oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 42:114–121.
78. **Liu CF, Liu C, Yao HH. 2010.** Building pathways for ovary organogenesis in the mouse embryo. *Current Topics in Developmental Biology*, 90, 263–290.

79. **Lonergan P, Rizos D, Gutierrez-Adan A, Fair T & Boland MP. 2003.** Oocyte and embryo quality: effect of origin, culture conditions and gene expression patterns. *Reprod. dom. Anim.*, 38 (4), 259-267.
80. **López A, Huanca W, Leyva V, Falcón N, Huanca T, Ratto M. 2006.** Inducción de la ovulación en llamas mediante la administración intramuscular del plasma seminal de llama, alpaca y toro. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 17(2), 114-118. doi:<http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v17i2.1520>
81. **Lucy MC, Savio JD, Badinga L, De La Sota RL, Thatcher WW. 1992.** Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle. *J Anim Sci* 70: 3615-3626.
82. **Lunardelli PA, Miguez-González S, Zandonadi-Machado F, Simões Rafagnin-Marinho L, Marcondes-Seneda M. 2013.** Folículos preantrales, emergencia folicular y aplicaciones. *Spermova* 3(2): 130 – 133
83. **Lussier JG, Matton P, Dufour IJ. 1987.** Growth rates of follicles in the ovary of the cow. *Journal of Reproduction and Fertility* 81(2): 301-7.
84. **Mamani C, Huanca W, Echevarría L, Cordero A, Huanca WF, Limache T. 2016.** Susceptibilidad del cuerpo lúteo a la prostaglandina F2a en alpacas inducidas a ovulación con plasma seminal y GnRH. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 27(4), 729-735.
85. **Manjunatha BM, Pratap N, Al-Bulushi S, Hago BE. 2012.** Characterization of ovarian follicular dynamics in dromedary camels (*Camelus dromedarius*). *Theriogenology*, 78(5), 965-973. <https://doi.org/10.1016/j.Theriogenology.2012.05.011>
86. **Martinuk S, Manning A, Black W, Murphy B. 1991.** Effects of carbohydrates on the pharmacokinetics and biological activity of equine chorionic gonadotrophin *in vivo*. *Biol Reprod*, 45:598-604.
87. **Mazaud S, Guyot R, Guigon CJ, Coudouel N, Le Magueresse-Battistoni B, Magre S. 2005.** Basal membrane remodeling during follicle histogenesis in the rat ovary: Contribution of proteinases of the MMP and PA families. *Developmental Biology*, 277, 403–416.

88. **McGee EA, Hsueh AJ. 2000.** Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocr. Rev* 21: 200–214.
89. **Mendoza VR. 2012.** Producción y evaluación de embriones por superovulación mediante la utilización de la eCG y FSH en alpacas huacaya (*Vicugna pacus*) a 2730 m.s.n.m. Tesis de Médico Veterinario. Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. Pp 80
90. **Mehlmann LM. 2005.** Stops and starts in mammalian oocytes: Recent advances in understanding the regulation of meiotic arrest and oocyte maturation. *Reproduction*, 130, 791–799.
91. **Monk M, McLaren A. 1981.** X-chromosome activity in foetal germ cells of the mouse. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 63, 75–84.
92. **Monniaux D, Huet C, Besnard N, Clément F, Bosc M, Pisselet C, Monget P, Mariana JC. 1997.** Follicular growth and ovarian dynamics in mammals. *J Reprod Fertil Suppl* 51: 3-23.
93. **Monniaux D, Mariana JC, Gibson WR. 1984.** Action of PMSG on follicular populations in the heifer. *J Reprod Fertil*, 70:243-253.
94. **Monniaux D, Barbey S, Rico C, Fabre S, Gallard Y, Larroque H. 2010.** Anti-Mullarian hormone: a predictive marker of embryo production in cattle? *Reprod Fertil Dev*, 22:1083-1091.
95. **Morotti F, Bergamo LZ, Rosenthal R, Sarapião F D, Silva NC, Appolonio E, & Seneda MM. 2016.** Diferenças entre *Bos indicus* e *Bos taurus* que podem impactar a eficiência das biotécnicas da reprodução. 7º Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada, 34-53.
96. **Mossa F, Carter F, Walsh SW, Kenny DA, Smith GW, Ireland JLH, Hildebrandt TB, Lonergan P, Ireland JJ, Evans ACO. 2013.** Maternal undernutrition in cows impairs ovarian and cardiovascular systems in their offspring. *Biol Reprod*, 88:92, 1-9.
97. **Mossa F, Walsh SW, Butler ST, Berry DP, Carter F, Lonergan P, Smith GW, Ireland JJ, Evans AC. 2012.** Low numbers of ovarian follicles  $\geq 3$  mm in diameter are associated with low fertility in dairy cows. *J Dairy Sci*, 95:2355-2361.



98. **Novoa C, Franco E, García W y Pezo D. 1999.** Dosis de Gonadotropinas (eCG y hCG), superovulación y obtención de embriones en alpacas. RIVEP. Perú. 10(1), 48-53.
99. **Novoa C, Sumar J. 1968.** Colección de huevos in vivo y ensayo de transferencia en alpaca. In: Boletín Extraordinario IVITA. Univ. Nacional Mayor de San Marcos, Lima (Perú), pp. 31-34.
100. **Ott M, Gogvadze V, Orrenius S, Zhivotovsky B. 2007.** Mitochondria oxidative stress and cell death. Apoptosis, 12, 913-922
101. **Pacheco J, Pezo D, Velez V, Bravo W. 2017.** Descripción ecográfica del inicio de la actividad ovárica en Alpacas (*Vicugna pacos*). Revista de Investigaciones Altoandinas, 19(2), 195-200.
102. **Palma G. 2001.** Biotecnología de la reproducción. Argentina: Ediciones INTA. 701 p.
103. **Papkoff H. 1978.** Relationship of PMSG to the pituitary gonadotrophins. En: Control of reproduction in the cow. Ed: J.M. Sreenan. Martín Nijhoff, The Hague. Pp: 73-86.
104. **Parraguez V, Adams G, Ratto M, Raggi L. 2010.** Camelids. En: DesCôteaux L, Colloton J, Gnemmi G. edits. Practical Atlas of Ruminant and Camelid Reproductive Ultrasonography. Iowa: Wiley-Blackwell. p. 211-241.
105. **Pepling M. 2013.** Oocyte Development before and during Folliculogenesis. In Krisher RL, Eds. Oocyte physiology and development in domestic animals. New York: Wiley-Blackwell. p 1-19
106. **Penninck D, d'Anjou. 2015.** Atlas of Small Animal Ultrasonography. 2ª edic. Iowa: Wiley Blackwell. 586 p.
107. **Peters H, & McNatty KP. 1980.** The ovary: A correlation of structure and function in mammals. Univ of California Press.
108. **Pierson RA, Ginther OJ. 1987.** Reliability of diagnostic ultrasonography for identification and measurement of follicles and detecting the corpus luteum in heifers. Theriogenology, 28: 929-936.
109. **Ponce D. 2010.** Recuperación de embriones de alpacas con dos tratamientos superovulatorios. Tesis Ing. Zoot. Lima, Perú. Universidad Nacional Agraria La Molina. 61 pp.

110. **Ramalho-Santos J, Varum S, Amaral S, Mota PC, Sousa AP & Amaral A. 2009.** Mitochondrial functionality in reproduction: from gonads and gametes to embryos and embryonic stem cells. *Human Reproduction Update*, 15, 553-572.
111. **Ratto M N, Gomez C, Wolter M, Berland M y Adams GP. 1999.** Superstimulatory response and oocyte collection in alpacas. II Congreso Mundial sobre Camélidos. Cusco-Perú. pp: 96-97.
112. **Ratto MH, Leduc YA, Valderrama XP, van Straaten KE, Delbaere LT, Pierson RA, Adams GP. 2012.** The nerve of ovulation-inducing factor in semen. *Proc Natl Acad Sci USA* 109 ( 37 ): 15042–7.10.1073 / pnas.1206273109
113. **Ratto MH, Silva ME, Huanca W, Huanca T, Adams GP. 2013.** Induction of superovulation in South American camelids. *Anim Reprod Sci.* 136:164-169.
114. **Reyna JL. 2006.** Embryo transfer in south american camelids. *The Camelid Quarterly.* 5 (4), pp. 79 – 93
115. **Ribadu AY, Nakao T. 1999.** Bovine reproductive ultrasonography: a review. *Journal of Reproduction and Development*, 45(1), 13-28.
116. **Rico C, Drouilhet L, Salvetti P, Dalbiès-Tran R, Jarrier P, Touzé J-L, Pillet E, Ponsart C, Fabre S, Monniaux D. 2012.** Determination of anti-Müllerian hormone concentrations in blood as a tool to select Holstein donor cows for embryo production: from the laboratory to the farm. *Reproduction, Fertility and Development* 24(7): 932-944
117. **Roche JF, Ireland JJ. 1984.** Manipulation of ovulation in cattle. *Proc. 10<sup>th</sup> Int. Congr. Reprod. A. I. Urbana – Champaing.* Vol IV, 9-17.
118. **Rodriguez J, Pearson L & Tibary. 2014.** Infertility and subfertility in the female camelid. En C. Cebra, D. Anderson, A. Tibary, R. Van Saun, L. Johnson (Eds.), *Llama and Alpaca Care* (216-242). Canadá: Elsevier Inc.
119. **Rosales AM, Sánchez A, Gutiérrez C. 2012.** Follicular development in domestic ruminants. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 15(1): S147 – S160.

120. **Sawyer HR, Smith P, Heath DA, Juengel JL, Wakefield SJ, McNatty KP. 2002.** Formation of ovarian follicles during fetal development in sheep. *Biology of Reproduction*, 66, 1134–1150.
121. **Schams D, Menzer C, Schallenberger E, Hoffman B, Hahn J and Hahn R. 1978.** Some studies of the pregnant mare serum gonatrophin (PMSG) and on endocrine reponses after application for superovulation in cattle. En: *Control of reproduction in the cow*. Ed: J.M. Sreenan. Martin Nijhoff, The Hague. Pp: 122-142.
122. **[SENAMHI] Servicio Nacional de Meteorología e Hidrología del Perú. 2016.** Estación meteorológica del Centro de Investigación y Producción Chuquibambilla. UNA- Puno.
123. **Silva-Santos KC, Marinho LSR, Santos GMG, Machado FZ, Gonzalez SM, Lisboa LA, & Seneda M. 2013.** Ovarian follicle reserve: emerging concepts and applications. *Animal Reproduction*, 10, 180-186.
124. **Singh J, Dominguez M, Jaiswal R, Adams GP. 2004.** A simple ultrasound test to predict the superstimulatory response in cattle. *Theriogenology*, 62:227-243.
125. **Sirard MA, Florman HM, Leibfried-Rutledge ML, Barnes FL, Sims ML, First, NL. 1989.** Timing of nuclear progression and protein synthesis necessary for meiotic maturation of bovine oocytes. *Biol. Reprod.* 40:1257–1263.
126. **Sirard MA, Robert C, Gagne D, Barnes FL, Bousquet D. 2000.** Oocyte quality and embryo production in cattle. *Biocell* 24, 256.
127. **Smitz JE, Cortvrindt RG. 2002.** The earliest stages of folliculogenesis *in vitro*. *Reproduction*, 123, 185–202.
128. **Correa JE, Rate MH, Gatica R. 1994.** Estrus Activity and Ovarian Response in Llamas and Alpacas Treated with Progesterone and PMSH or FSH. *Arch Med Vet.* 26:59-64.
129. **Songsasen N. 2012.** Energy metabolism regulating mammalian oocyte maturation. INTECH Open Access Publisher.
130. **Sumar JB. 2013.** Embryo transfer in domestic South American camelids. *Anim Reprod Sci* 136: 170-177.
131. **Sumar J, Picha Y. 2014.** Embryo transfer. En C. Cebra, D. Anderson, A. Tibary, R. Van Saun, L. Johnson (Eds.), *Llama and Alpaca Care* (315-321). Canadá: Elsevier Inc.

132. **Sutton ML, Gilchrist RB, Thompson JG. 2003.** Effects of *in-vivo* and *in-vitro* environments on the metabolism of the cumulus-oocyte complex and its influence on oocyte developmental capacity. *Human Reproduction Update*, 9, 35-48.
133. **Taylor S, Taylor P J, James A N, Denniston R S y Godke R. 2001.** Alpaca offspring born after cross species embryo transfer to llama recipients. *Theriogenology*. 53, 1-344.
134. **Terzano GM. 2012.** Ultrasonography and Reproduction in Buffalo. *Journal of Buffalo Science* 1(2): 163-173
135. **Themmen AP. 2005.** Anti-Mullerian hormone: its role in follicular growth initiation and survival and as an ovarian reserve marker. *J Natl Cancer Inst Monogr*, 34:18-21.
136. **Tibary A, Anouassi A, Sghiri A, Khatir H. 2007.** Current Knowledge and Future challenges in Camelid Reproduction, Society of Reproduction and Fertility, vol. 64. Nottingham University Press, Nottingham, pp. 297–313.
137. **Tibary A, Anouassi A. 1997.** Artificial breeding and manipulation of reproduction in camelidae. In: Hassan II, Rabat, Maroc, editors. *Theriogenology in camelidae: Anatomy, Physiology, BSE, Pathology and Artificial Breeding*. Abu Dhabi: Abu Dhabi Printing and Publishing Company; p. 413-457.
138. **Tibary A, Pearson LK, Campbell A. 2015.** Embryo transfer in camelids. *Spermova* 5(2): 234-252
139. **Tingen C, Kim A, Woodruff TK. 2009.** The primordial pool of follicles and nest breakdown in mammalian ovaries. *Molecular Human Reproduction*, 15, 795-803.
140. **Trasorras V, Chaves MG, Neild D, Gambarotta M, Aba M, Agüero A. 2010.** Embryo transfer technique: factors affecting the viability of the corpus luteum in llamas. *Anim. Reprod. Sci.* 121, 279–285.
141. **Van Saun RJ, Herdt TH. 2014.** Nutritional assessment. In: Cebra C, Anderson DE, Tibary A, Van Saun RJ, LaRue WJ. (Eds). *Llama and alpaca care: medicine, surgery, reproduction, nutrition and herd health* (100-123). Canada: Elsevier Inc.
142. **Vásquez YA. 2018.** Caracterización de la emergencia y repetibilidad de la onda folicular en alpacas (*Vicugna pacos*). Tesis para optar el Título de Médico Veterinario en la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Recuperado de <http://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/cybertesis/10282>

143. **Vaughan JL, Macmillan KL, MJ D'Occhio. 2004.** Ovarian follicular wave characteristics in alpacas. *Anim. Reprod. Sc.* 80: 353–361
144. **Vaughan JL, Macmillan KL, Anderson GA, D'Occhio MJ. 2003.** Effects of mating behaviour and the ovarian follicular state of female alpacas on conception. *Aust. Vet. J.* 81, 64–68.
145. **Vaughan JL, Mihm M, Wittek T. 2013.** Factors influencing embryo transfer success in alpacas-A retrospective study. *Anim. Reprod. Sc.* 136:194– 204.
146. **Villaraza CJ. 2016.** Producción de hormona gonadotrofina coriónica equina recombinante en células CHO-K1. [Internet], [15 de marzo 2017] disponible en: <http://bibliotecavirtual.unl.edu.ar:8080/colecciones/bitstream/handle/123456789/8367/2.3.13.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
147. **Vivanco MHW, Salazar MP, Gonzales MM, Tapia MA. 2014a.** Comparative efficiency of gonadotropin-releasing hormone and luteinizing hormone in the induction of ovulation in superovulated alpacas. *Reproduction, Fertility and Development*, 26(1), 168-168.
148. **Vivanco MHW, Ponce D, Miguel M, Youngs C, Huamán E, León S, Asparrin M. 2014b.** Repetibilidad de la respuesta ovárica y de la producción Embrionaria en alpacas huacaya superovuladas. *aSPRA, Spermova*. 2014; 4(1): 77 – 79. Lima-Perú.
149. **Vivanco WH. 2013.** Strategies for superovulation, embryo production and transfer in sheep and alpacas. 29th Annual Meeting, European Embryo Transfer Association (AETE) – Turkey. pp. 43-74
150. **Wang J, Roy SK. 2004.** Growth differentiation factor-9 and stem cell factor promote primordial follicle formation in the hamster: modulation by follicle stimulating hormone. *Biol Reprod* 70(3): 577-85
151. **Webb R, Buratini J, Hernandez-Medrano JH, Gutierrez CG, Campbell BK. 2016.** Follicle development and selection: past, present and future. *Animal Reproduction*, 13(3), 234-249.
152. **Webb R, Campbell BK. 2007.** Development of the dominant follicle: mechanisms of selection and maintenance of oocyte quality. *Soc Reprod Fertil Suppl*, 64:141-163.

153. **Witschi E. 1948.** Migration of the germ cells of human embryos from the yolk sac to the primitive gonadal folds. Contribution to Embryology Carnegie Institution, 32, 67–80.

## **VIII. APÉNDICES**

Anexo 1A. Ficha de recolección de datos para seguimiento de onda la folicular



**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**

Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA

**Facultad de Medicina Veterinaria**

**UNIDAD DE POSTGRADO**

**Ovariograma-Ficha Individual de Recolección de datos**




Registro: ..... Raza: ..... Identificación: .....  
 Color: .....


FECHA	OVARIO IZQUIERDO	OVARIO DERECHO	OBSERVACIONES
Hora:			
Hora:			
Hora:			
Hora:			



Anexo 2A. Ficha de recolección de datos para el protocolo de superovulación con eCG.



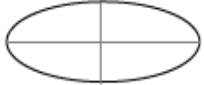


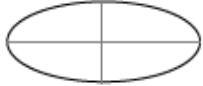
**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**  
 Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA  
 Facultad de Medicina Veterinaria  
 UNIDAD DE POSTGRADO



Ficha Individual de Recolección de datos Ovulación Múltiple y Producción de embriones con eCG

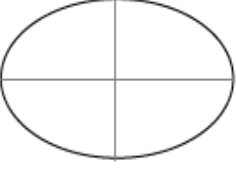
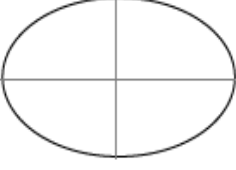
Registro: ..... Raza: ..... Identificación: ..... Color: .....

DIA 0: \_\_\_\_\_

FECHA	OVARIO IZQUIERDO	OVARIO DERECHO	OBSERVACIONES
Hora: _____			CCS: Peso:
Hora: _____			1ra. Muestra sangre

Observaciones: \_\_\_\_\_

DIA 01: \_\_\_\_\_

FECHA	OVARIO IZQUIERDO	OVARIO DERECHO	OBSERVACIONES
Hora: _____			Ovulación ( ) No ovulación ( ) 2da. Muestra sangre

Tratamiento superovulatorio:

Hora: \_\_\_\_\_ Producto: \_\_\_\_\_ Dosis: \_\_\_\_\_ Cantidad: \_\_\_\_\_

Observaciones: \_\_\_\_\_

DIA 04: (3ra. Muestra sangre) \_\_\_\_\_

Observaciones: \_\_\_\_\_

DIA 06: \_\_\_\_\_

Tratamiento luteolítico:

Hora: \_\_\_\_\_ Producto: \_\_\_\_\_ Dosis: \_\_\_\_\_ Cantidad: \_\_\_\_\_

Observaciones: .....

A

FECHA	OVARIO IZQUIERDO	OVARIO DERECHO	OBSERVACIONES
Hora:			4ta. Muestra sangre

EMPADRE:

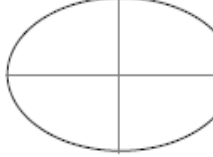
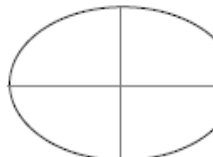
1er. Empadre:

2do. Empadre:

a.m.	p.m.	Observaciones	a.m.	p.m.	Observaciones
Fecha:.....		Inducción ovulación: Hora: .....	Fecha: .....		
Macho:.....		Producto: .....	Macho:.....		
Identificación:.....		.....	Identificación:.....		
Hora inicio:.....		Dosis:.....	Hora inicio:.....		
Hora término:.....		Cantidad: .....	Hora término:.....		

DÍA 14: .....

Registro de Recuperación de embriones:

FECHA	OVARIO IZQUIERDO	OVARIO DERECHO	OBSERVACIONES
Hora:			

N°	Tamaño ( )	Clasificación (E,B,R,M,O)	Estadio (M,BI,B,BE)	Observaciones	N°	Tamaño ( )	Clasificación (E,B,R,M,O)	Estadio (M,BI,B,BE)	Observaciones
01					08				
02					09				
03					10				
04					11				
05					12				
06					13				
07					14				

Tratamiento luteolítico:

Hora:..... Producto:..... Dosis:..... Cantidad:.....

B

Anexo 3A. Prueba estadística de normalidad Shapiro-Wilk de las variables estudiadas

Ho: Los datos tienen distribución normal

Ha: Los datos no tienen distribución normal

Si p-value es mayor a 0.05, entonces diremos que los datos son normales (se acepta la Ho), pero si es menor a 0.05 diremos que los datos no son normales (se rechaza la Ho).

Shapiro-Wilk < 50 (N)

Kolmogorov-Smirnov > 50(N)

Pruebas de normalidad						
	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Número de folículos emergentes ≥3mm 1ra Onda	,204	26	,007	,780	26	,000
Número de Folículos emergentes ≥3mm 2da Onda	,194	26	,013	,925	26	,059
Número de Folículos emergentes ≥3mm 3ra. Onda	,226	26	,001	,864	26	,003
Tamaño de Folículo inducido a la Ovulación al día cero de la Superovulación	,147	26	,156	,911	26	,028
Número de folículos emergentes ≥3mm a las 36h pos inducción de la Ovulación de la SO	,175	26	,040	,929	26	,074
Número de folículos de 3 a 7mm al D 7.5 de iniciado el protocolo superovulatorio con eCG	,227	26	,001	,796	26	,000
Número de folículos ≥7mm al D 7.5 de iniciado el protocolo superovulatorio con eCG	,159	26	,088	,933	26	,090
Tamaño de folículos ≥7mm al D 7.5 de iniciado el protocolo superovulatorio con eCG	,098	26	,200*	,943	26	,163
Tamaño de cuerpos lúteos al día 14 de iniciado el protocolo superovulatorio con eCG	,102	26	,200*	,964	26	,478
Número de cuerpos lúteos al día 14 de iniciado el protocolo superovulatorio con eCG	,115	26	,200*	,975	26	,752
Total de Folículos ≥3mm al D 7.5 de iniciado el protocolo de superovulación con eCG	,163	26	,074	,904	26	,020
Tamaño de folículos luteinizados al día 14 de iniciado el protocolo superovulatorio con eCG	,233	10	,132	,829	10	,033
Número de folículos luteinizados al día 14 de iniciado el protocolo superovulatorio con eCG	,270	10	,037	,848	10	,055
Tamaño de folículos anovulatorios al día 14 de iniciado el protocolo superovulatorio con eCG	,187	14	,199	,909	14	,152
Número de folículos anovulatorios al día 14 de iniciado el protocolo superovulatorio con eCG	,297	14	,001	,657	14	,000
Número total de embriones	,186	19	,083	,889	19	,031

\*. Esto es un límite inferior de la significación verdadera.

a. Corrección de significación de Lilliefors

Anexo 4A. Prueba de hipótesis no paramétrica de Mann-Whitney para el tamaño del folículo inducido a la ovulación al día cero de la SO, número de folículos de 3 a 7mm de diámetro al D 7.5; número total de embriones, tamaño de folículos luteinizados, número de folículos anovulatorios al día 14 en alpacas superestimuladas con eCG, según grupos experimentales

Rangos				
	Grupos Experimentales	N	Rango promedio	Suma de rangos
Número de folículos de 3 a 7mm al D 7.5 de iniciado el protocolo superovulatorio con eCG	GE01	15	13,57	203,50
	GE02	11	13,41	147,50
	Total	26		
Número total de embriones	GE01	12	10,25	123,00
	GE02	7	9,57	67,00
	Total	19		
Tamaño de folículos luteinizados al día 14 de iniciado el protocolo superovulatorio con eCG	GE01	5	4,00	20,00
	GE02	5	7,00	35,00
	Total	10		
Número de folículos anovulatorios al día 14 de iniciado el protocolo superovulatorio con eCG	GE01	7	8,43	59,00
	GE02	7	6,57	46,00
	Total	14		
Tamaño de Folículo inducido a la Ovulación al día cero de la Superovulación	GE01	15	15,27	229,00
	GE02	11	11,09	122,00
	Total	26		

Estadísticos de prueba <sup>a</sup>					
	Número de folículos de 3 a 7mm al D 7.5 de iniciado el protocolo superovulatorio con eCG	Número total de embriones	Tamaño de folículos luteinizados al día 14 de iniciado el protocolo superovulatorio con eCG	Número de folículos anovulatorios al día 14 de iniciado el protocolo superovulatorio con eCG	Tamaño de Folículo inducido a la Ovulación al día cero de la Superovulación
U de Mann-Whitney	81,500	39,000	5,000	18,000	56,000
W de Wilcoxon	147,500	67,000	20,000	46,000	122,000
Z	-,052	-,262	-1,571	-,926	-1,377
Sig. asintótica(bilateral)	,958	,794	,116	,354	,169
Significación exacta [2*(sig. unilateral)]	,959 <sup>b</sup>	,837 <sup>b</sup>	,151 <sup>b</sup>	,456 <sup>b</sup>	,180 <sup>b</sup>

a. Variable de agrupación: Grupos Experimentales

b. No corregido para empates.

Anexo 5A. Prueba de hipótesis paramétrica t de student para el número de folículos emergentes  $\geq 3\text{mm}$  a las 36h, número y tamaño de folículos  $\geq 7\text{mm}$  de diámetro, número de cuerpos lúteos, número de folículos luteinizados y tamaño de folículos anovulatorios en alpacas superestimuladas con eCG, según grupos experimentales.

Ho: Los promedios de los GEs son iguales

Ha: Los promedios de los GEs son diferentes

**Estadísticas de grupo**

	Grupos Experimentales	N	Media	Desv. Desviación	Desv. Error promedio
Número de folículos emergentes $\geq 3\text{mm}$ a las 36h pos inducción de la Ovulación de la SO	GE01	15	2,33	1,234	,319
	GE02	11	2,09	1,578	,476
Número de folículos $\geq 7\text{mm}$ al D 7.5 de iniciado el protocolo superovulatorio con eCG	GE01	15	7,47	3,962	1,023
	GE02	11	10,09	6,268	1,890
Tamaño de folículos $\geq 7\text{mm}$ al D 7.5 de iniciado el protocolo superovulatorio con eCG	GE01	15	8,4567	1,07268	,27697
	GE02	11	8,7677	,85113	,25662
Tamaño de cuerpos lúteos al día 14 de iniciado el protocolo superovulatorio con eCG	GE01	15	10,6533	1,21823	,31455
	GE02	11	11,4270	2,54458	,76722
Número de cuerpos lúteos al día 14 de iniciado el protocolo superovulatorio con eCG	GE01	15	7,20	3,278	,846
	GE02	11	9,27	5,022	1,514
Número de folículos luteinizados al día 14 de iniciado el protocolo superovulatorio con eCG	GE01	5	1,60	,548	,245
	GE02	5	2,80	1,304	,583
Tamaño de folículos anovulatorios al día 14 de iniciado el protocolo superovulatorio con eCG	GE01	7	16,4714	5,80595	2,19444
	GE02	7	18,4429	4,14080	1,56507

# Prueba de muestras independientes

		Prueba de Levene de igualdad de varianzas		prueba t para la igualdad de medias						
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia	
									Inferior	Superior
Número de folículos emergentes $\geq 3\text{mm}$ a las 36h pos inducción de la Ovulación de la SO	Se asumen varianzas iguales	,502	,485	,440	24	,664	,242	,551	-,895	1,380
	No se asumen varianzas iguales			,423	18,347	,677	,242	,573	-,959	1,444
Número de folículos $\geq 7\text{mm}$ al D 7.5 de iniciado el protocolo superovulatorio con eCG	Se asumen varianzas iguales	4,081	,055	-1,308	24	,203	-2,624	2,006	-6,764	1,515
	No se asumen varianzas iguales			-1,221	15,751	,240	-2,624	2,149	-7,186	1,937
Tamaño de folículos $\geq 7\text{mm}$ al D 7.5 de iniciado el protocolo superovulatorio con eCG	Se asumen varianzas iguales	2,569	,122	-,794	24	,435	-,31106	,39157	-1,11923	,49711
	No se asumen varianzas iguales			-,824	23,799	,418	-,31106	,37758	-1,09069	,46857
Tamaño de cuerpos lúteos al día 14 de iniciado el protocolo superovulatorio con eCG	Se asumen varianzas iguales	5,822	,024	-1,032	24	,312	-,77365	,74936	-2,32025	,77294
	No se asumen varianzas iguales			-,933	13,374	,367	-,77365	,82919	-2,55993	1,01263
Número de cuerpos lúteos al día 14 de iniciado el protocolo superovulatorio con eCG	Se asumen varianzas iguales	3,021	,095	-1,275	24	,215	-2,073	1,626	-5,428	1,283
	No se asumen varianzas iguales			-1,195	16,101	,249	-2,073	1,735	-5,748	1,603
Número de folículos luteinizados al día 14 de iniciado el protocolo superovulatorio con eCG	Se asumen varianzas iguales	4,356	,070	-1,897	8	,094	-1,200	,632	-2,658	,258
	No se asumen varianzas iguales			-1,897	5,369	,112	-1,200	,632	-2,793	,393
Tamaño de folículos anovulatorios al día 14 de iniciado el protocolo superovulatorio con eCG	Se asumen varianzas iguales	,110	,745	-,731	12	,479	-1,97143	2,69537	-7,84414	3,901
	No se asumen varianzas iguales			-,731	10,849	,480	-1,97143	2,695	-7,91398	3,971

Anexo 6A. Prueba de hipótesis chi-cuadrado con corrección de continuidad para la comparación del número de alpacas superestimadas con eCG con colección embrionaria, según grupo experimental

**Alpacas con colección embrionaria\*Grupos Experimentales tabulación cruzada**

			Grupos Experimentales		Total
			GE01	GE02	
Alpacas con colección embrionaria	Sin colección	Recuento	3 <sub>a</sub>	3 <sub>a</sub>	6
		% dentro de Grupos Experimentales	20,0%	30,0%	24,0%
	Con colección	Recuento	12 <sub>a</sub>	7 <sub>a</sub>	19
		% dentro de Grupos Experimentales	80,0%	70,0%	76,0%
Total		Recuento	15	10	25
		% dentro de Grupos Experimentales	100,0%	100,0%	100,0%

Cada letra del subíndice denota un subconjunto de Grupos Experimentales categorías cuyas proporciones de columna no difieren de forma significativa entre sí en el nivel ,05.

**Pruebas de chi-cuadrado**

	Valor	Gl	Sig. asintótica (2 caras)	Significación exacta (2 caras)	Significación exacta (1 cara)
Chi-cuadrado de Pearson	,329 <sup>a</sup>	1	,566	,653	,455
Corrección de continuidad <sup>b</sup>	,009	1	,924		
Razón de verosimilitud	,325	1	,569		
Prueba exacta de Fisher					
N de casos válidos	25				

a. 2 casillas (50,0%) han esperado un recuento menor que 5. El recuento mínimo esperado es 2,40.

b. Sólo se ha calculado para una tabla 2x2

Anexo 7A. Prueba exacta de fisher para la comparación del número de alpacas superestimuladas con eCG según el número de embriones colectados y por grupo experimental

**Alpacas con colección embrionaria\*Grupos Experimentales tabulación cruzada**

			Grupos Experimentales		Total
			GE01	GE02	
Alpacas con colección embrionaria	un embrión	Recuento	4 <sub>a</sub>	2 <sub>a</sub>	6
		% dentro de Grupos Experimentales	33,3%	28,6%	31,6%
	dos embriones	Recuento	2 <sub>a</sub>	2 <sub>a</sub>	4
		% dentro de Grupos Experimentales	16,7%	28,6%	21,1%
	tres embriones	Recuento	3 <sub>a</sub>	2 <sub>a</sub>	5
		% dentro de Grupos Experimentales	25,0%	28,6%	26,3%
	cuatro y cinco embriones	Recuento	3 <sub>a</sub>	1 <sub>a</sub>	4
		% dentro de Grupos Experimentales	25,0%	14,3%	21,1%
Total		Recuento	12	7	19
		% dentro de Grupos Experimentales	100,0%	100,0%	100,0%

Cada letra del subíndice denota un subconjunto de Grupos Experimentales categorías cuyas proporciones de columna no difieren de forma significativa entre sí en el nivel ,05.

**Pruebas de chi-cuadrado**

	Valor	gl	Sig. asintótica (2 caras)	Significación exacta (2 caras)
Chi-cuadrado de Pearson	,592 <sup>a</sup>	3	,898	1,000
Razón de verosimilitud	,596	3	,897	1,000
Prueba exacta de Fisher	,909			1,000
N de casos válidos	19			

a. 8 casillas (100,0%) han esperado un recuento menor que 5. El recuento mínimo esperado es 1,47.



Anexo 8A. Prueba exacta de Fisher para la comparación del número de embriones colectados según calidad entre los grupos experimentales

**Resumen de procesamiento de casos**

	Casos					
	Válido		Perdidos		Total	
	N	Porcentaje	N	Porcentaje	N	Porcentaje
Calidad de embriones colectados * Grupos Experimentales	46	100,0%	0	0,0%	46	100,0%

**Calidad de embriones colectados\*Grupos Experimentales tabulación cruzada**

			Grupos Experimentales		Total
			GE01	GE02	
Calidad de embriones colectados	Excelente	Recuento % dentro de Grupos Experimentales	19 <sub>a</sub> 63,3%	7 <sub>a</sub> 43,8%	26 56,5%
	Bueno	Recuento % dentro de Grupos Experimentales	6 <sub>a</sub> 20,0%	1 <sub>a</sub> 6,3%	7 15,2%
	Regular	Recuento % dentro de Grupos Experimentales	2 <sub>a</sub> 6,7%	5 <sub>b</sub> 31,3%	7 15,2%
	Malo	Recuento % dentro de Grupos Experimentales	3 <sub>a</sub> 10,0%	3 <sub>a</sub> 18,8%	6 13,0%
Total		Recuento % dentro de Grupos Experimentales	30 100,0%	16 100,0%	46 100,0%

Cada letra del subíndice denota un subconjunto de Grupos Experimentales categorías cuyas proporciones de columna no difieren de forma significativa entre sí en el nivel ,05.

**Pruebas de chi-cuadrado**

	Valor	gl	Sig. asintótica (2 caras)	Significación exacta (2 caras)
Chi-cuadrado de Pearson	6,761 <sup>a</sup>	3	,080	,073
Razón de verosimilitud	6,716	3	,082	,153
Prueba exacta de Fisher	6,303			,088
N de casos válidos	46			

a. 6 casillas (75,0%) han esperado un recuento menor que 5. El recuento mínimo esperado es 2,09.

Anexo 9A. Prueba de hipótesis de chi-cuadrado con corrección de continuidad para la comparación de embriones transferibles y no transferibles entre Grupos experimentales

**Recuperación embrionaria\*Grupos Experimentales tabulación cruzada**

			Grupos Experimentales		Total
			GE01	GE02	
Recuperación embrionaria	Transferibles	Recuento	25	12	37
		% dentro de Grupos Experimentales	83,3%	75,0%	80,4%
	No transferibles	Recuento	5	4	9
		% dentro de Grupos Experimentales	16,7%	25,0%	19,6%
Total		Recuento	30	16	46
		% dentro de Grupos Experimentales	100,0%	100,0%	100,0%

**Pruebas de chi-cuadrado**

	Valor	Gl	Sig. asintótica (2 caras)	Significación exacta (2 caras)	Significación exacta (1 cara)
Chi-cuadrado de Pearson	,460 <sup>a</sup>	1	,497	,698	,378
Corrección de continuidad <sup>b</sup>	,083	1	,773		
Razón de verosimilitud	,449	1	,503	,698	,378
Prueba exacta de Fisher				,698	,378
N de casos válidos	46				

a. 1 casillas (25,0%) han esperado un recuento menor que 5. El recuento mínimo esperado es 3,13.

b. Sólo se ha calculado para una tabla 2x2

Anexo 10A. Prueba exacta de Fisher y diferencia múltiple de proporciones para la recuperación de embriones según grado de desarrollo en alpacas súper estimuladas con eCG según grupos experimentales

**Desarrollo embrionario\*Grupos Experimentales tabulación cruzada**

			Grupos Experimentales		Total
			GE01	GE02	
Desarrollo embrionario	Blastocistos	Recuento	28 <sub>a</sub>	13 <sub>a</sub>	41
		% dentro de Grupos Experimentales	90,3%	76,5%	85,4%
	Mórulas	Recuento	2 <sub>a</sub>	3 <sub>a</sub>	5
		% dentro de Grupos Experimentales	6,5%	17,6%	10,4%
	Ovocitos no fecundados	Recuento	1 <sub>a</sub>	1 <sub>a</sub>	2
		% dentro de Grupos Experimentales	3,2%	5,9%	4,2%
Total		Recuento	31	17	48
		% dentro de Grupos Experimentales	100,0%	100,0%	100,0%

Cada letra del subíndice denota un subconjunto de Grupos Experimentales categorías cuyas proporciones de columna no difieren de forma significativa entre sí en el nivel ,05.

**Pruebas de chi-cuadrado**

	Valor	gl	Sig. asintótica (2 caras)	Significación exacta (2 caras)
Chi-cuadrado de Pearson	1,754 <sup>a</sup>	2	,416	,535
Razón de verosimilitud	1,675	2	,433	,684
Prueba exacta de Fisher	2,107			,414
N de casos válidos	48			

a. 4 casillas (66,7%) han esperado un recuento menor que 5. El recuento mínimo esperado es ,71.

Anexo 11A. Prueba de hipótesis no paramétrica de Mann-Whitney para el número de folículos emergentes  $\geq 3$  mm de diámetro en tres ondas foliculares consecutivas según grupos experimentales

#### Rangos

	Grupos Experimentales	N	Rango promedio	Suma de rangos
Número de folículos emergentes $\geq 3$ mm 1ra Onda	GE01	15	8,00	120,00
	GE02	11	21,00	231,00
	Total	26		
Número de Folículos emergentes $\geq 3$ mm 2da Onda	GE01	15	11,90	178,50
	GE02	11	15,68	172,50
	Total	26		
Número de Folículos emergentes $\geq 3$ mm 3ra. Onda	GE01	15	11,70	175,50
	GE02	11	15,95	175,50
	Total	26		

#### Estadísticos de prueba<sup>a</sup>

	Número de folículos emergentes $\geq 3$ mm 1ra Onda	Número de Folículos emergentes $\geq 3$ mm 2da Onda	Número de Folículos emergentes $\geq 3$ mm 3ra. Onda
U de Mann-Whitney	,000	58,500	55,500
W de Wilcoxon	120,000	178,500	175,500
Z	-4,456	-1,288	-1,440
Sig. asintótica (bilateral)	,000	,198	,150
Significación exacta [2*(sig. unilateral)]	,000 <sup>b</sup>	,217 <sup>b</sup>	,164 <sup>b</sup>

a. Variable de agrupación: Grupos Experimentales

b. No corregido para empates.

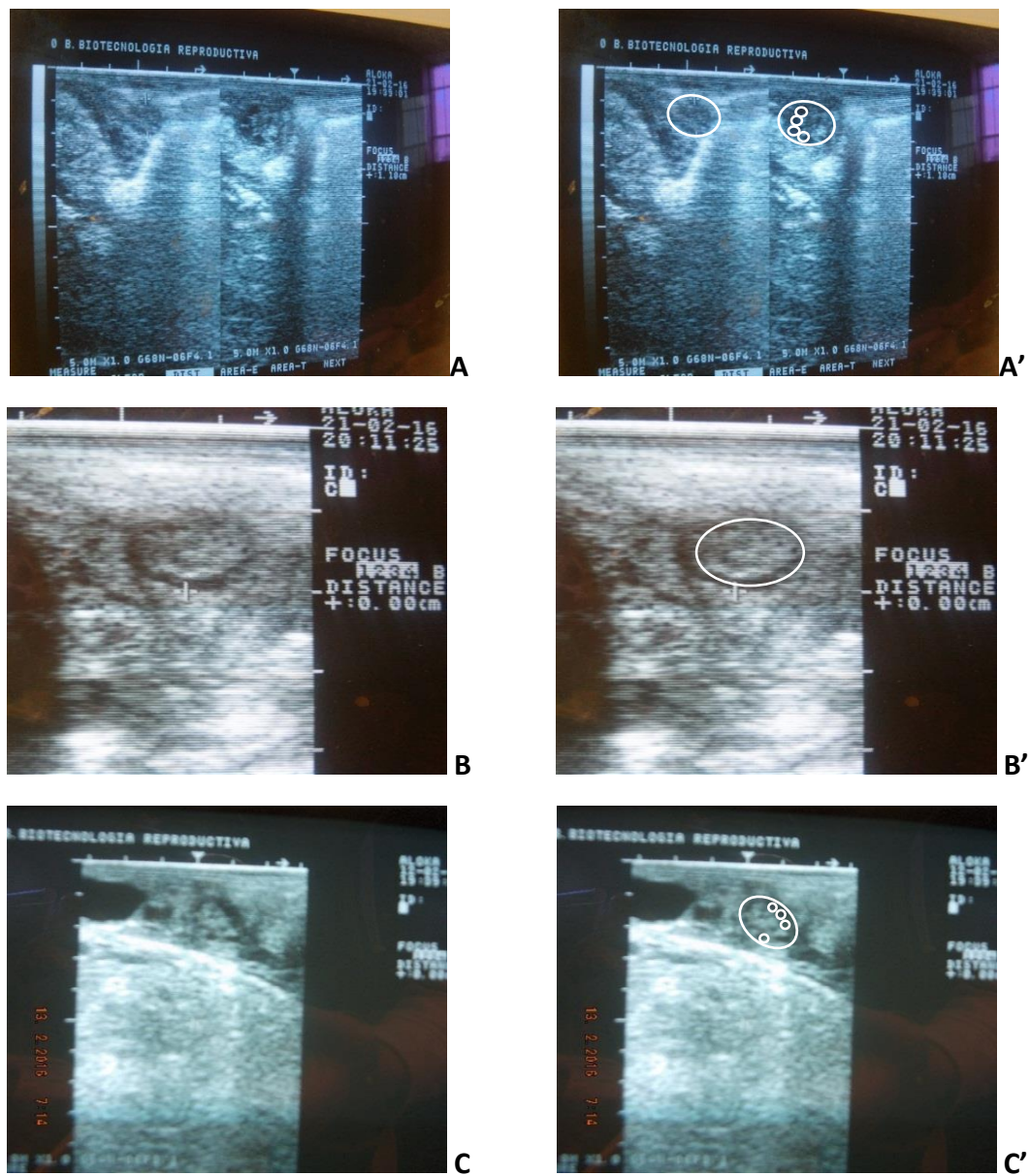


Figura 1A. Imágenes ultrasonográficas de emergencia folicular en alpacas suri (día 4) post-inducción de la ovulación con y sin folículos medibles  $\geq 3$  mm de diámetro (A, B, C) y su representación esquemática (A', B', C').

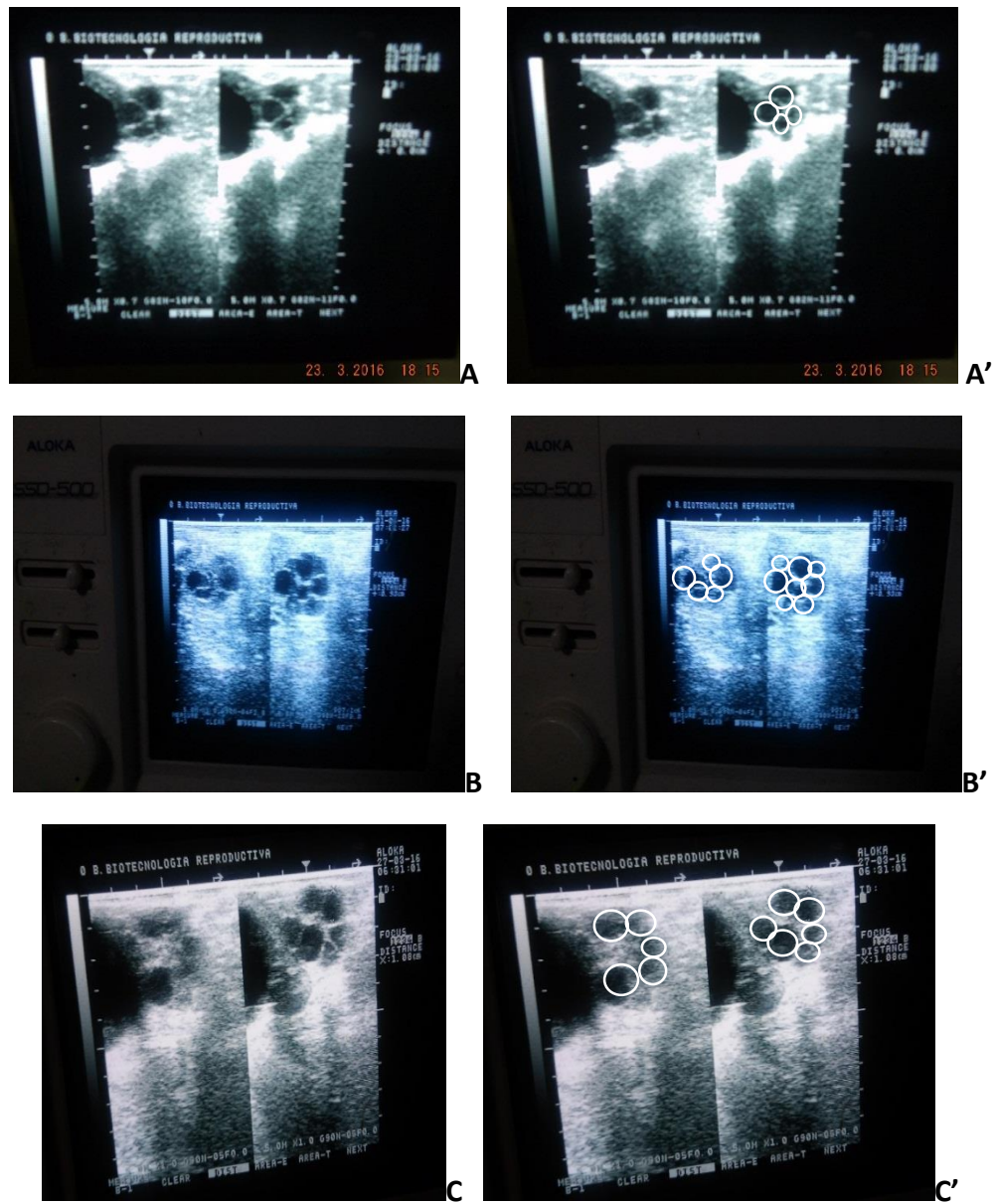


Figura 2A. Respuesta ovárica superovulatoria en alpacas suri con eCG al día 7.5 (A, B, C) y su representación esquemática (A', B', C')

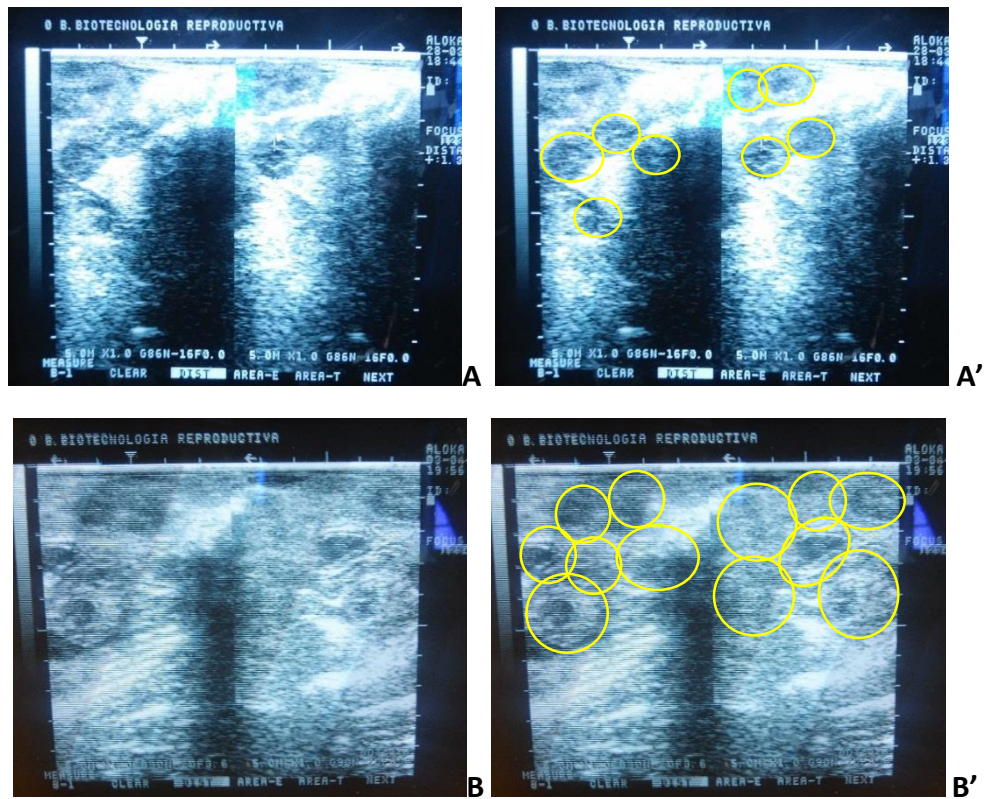


Figura 3A. Imágenes de cuerpos lúteos al D 14 de iniciado el protocolo de superovulación con eCG (A, B) y su representación esquemática (A', B')



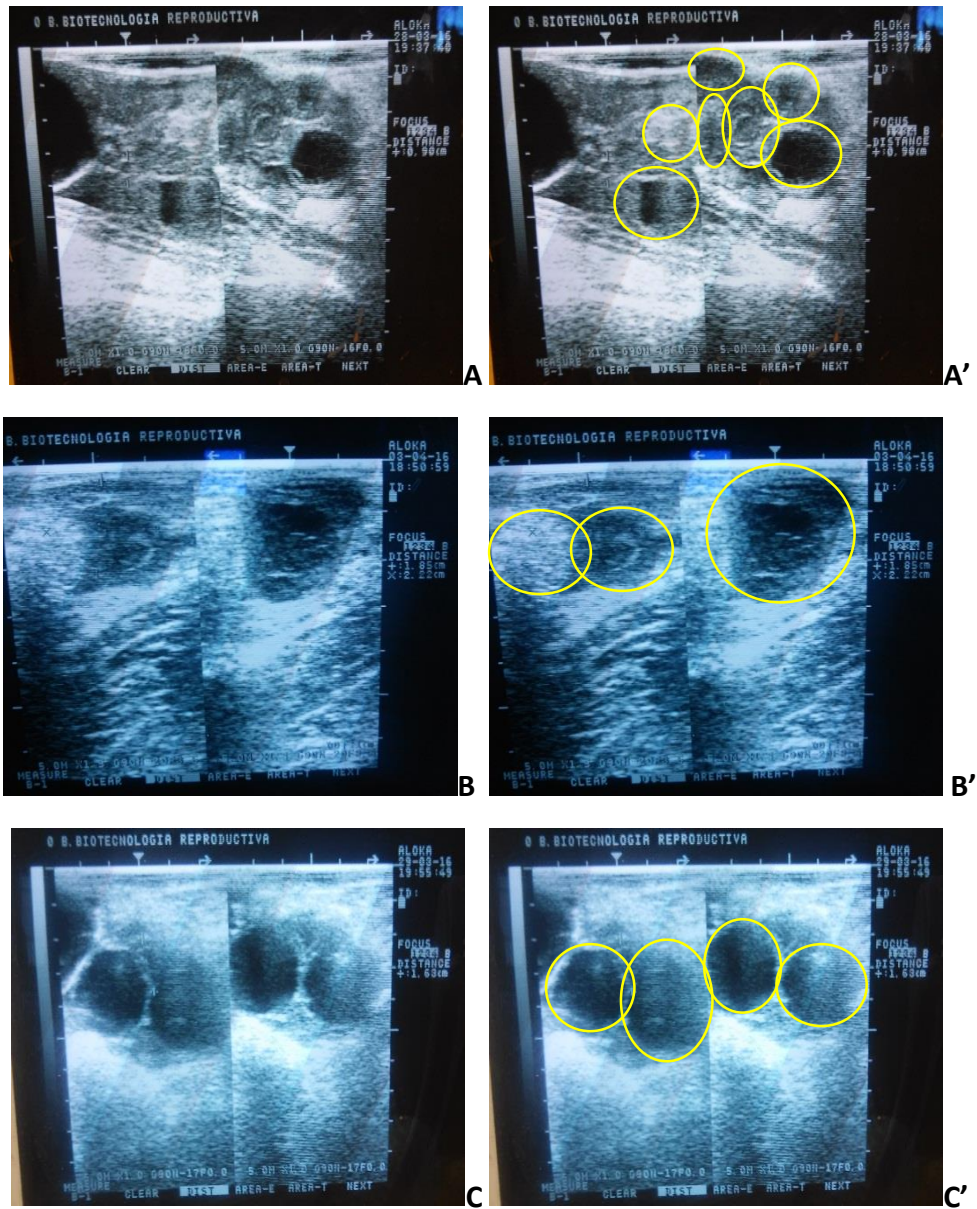


Figura 4A. Ovarios superestimados con eCG con presencia de cuerpos lúteos compactos, luteinizados y anovulatorios (A, B, C) y sus representaciones esquemáticas (A', B' C').



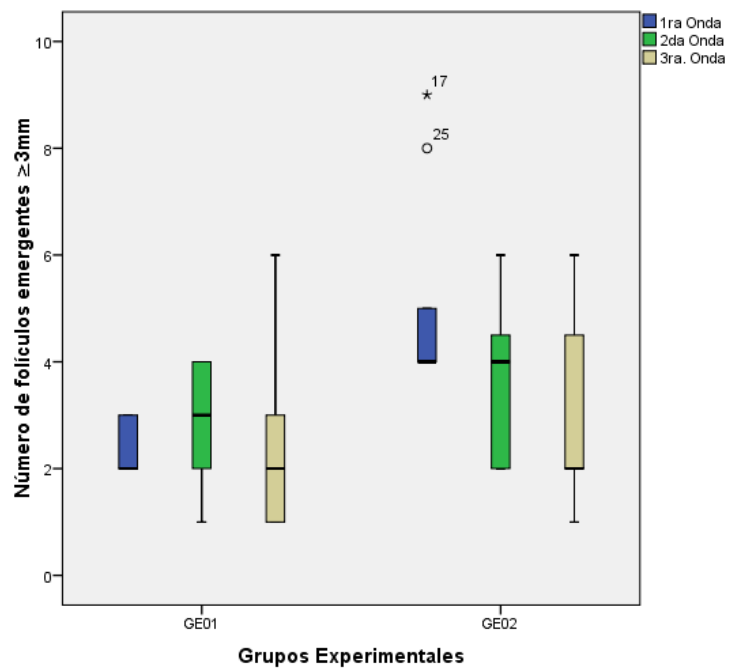


Figura 5A. Número de folículos emergentes  $\geq 3\text{mm}$  en la 1ra., 2da. y 3ra. onda folicular en alpacas según grupos experimentales.

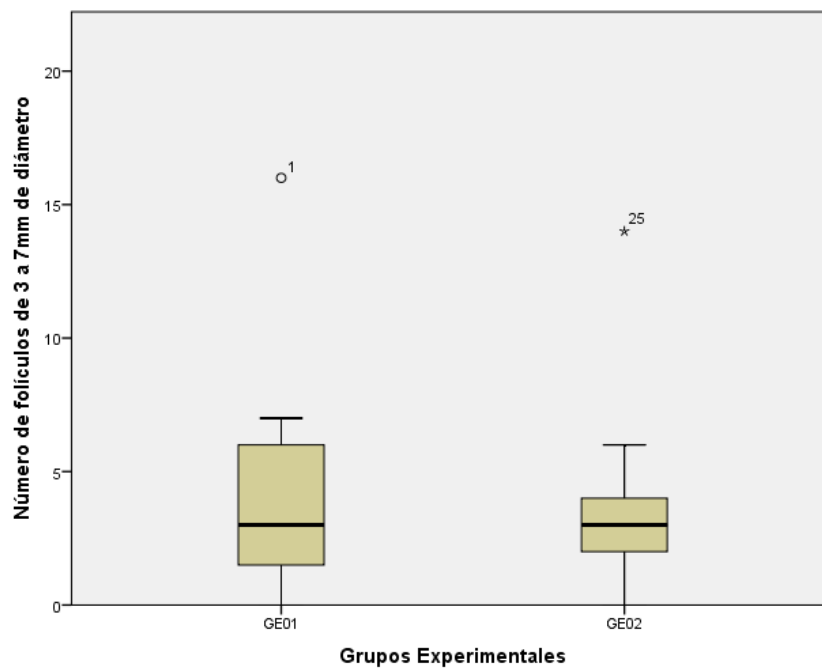


Figura 6A. Número de folículos de 3 a 7mm al día 7.5 de iniciado el protocolo de superestimulación ovárica con eCG en alpacas, según grupos experimentales.

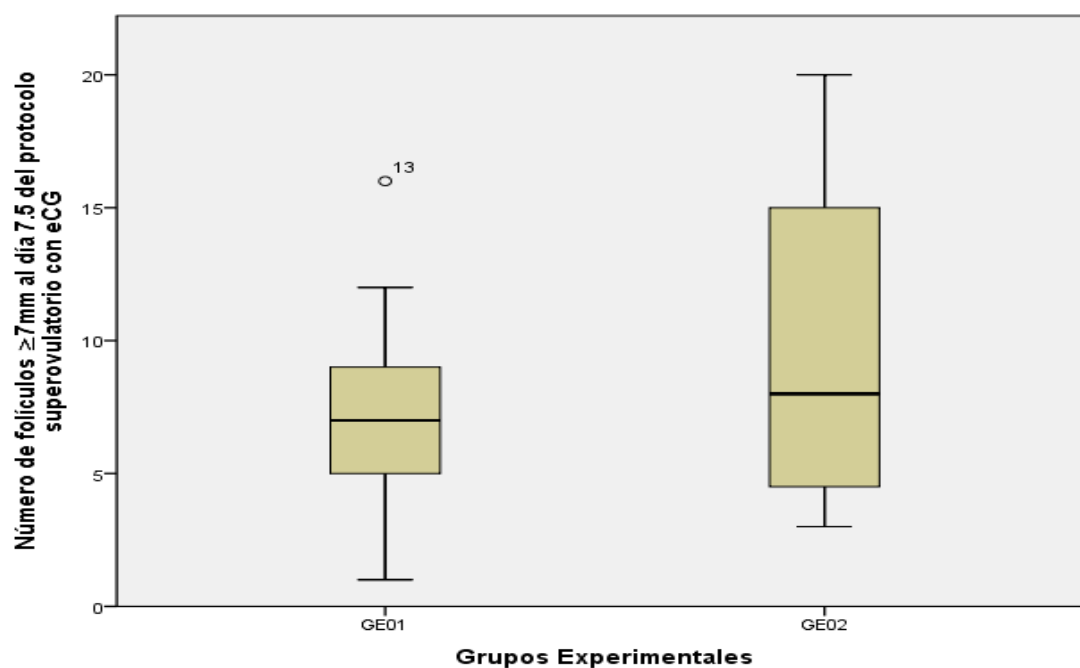


Figura 7A. Número de folículos  $\geq 7$  mm de diámetro como respuesta ovárica al tratamiento superovulatorio con eCG en alpacas, según grupos experimentales

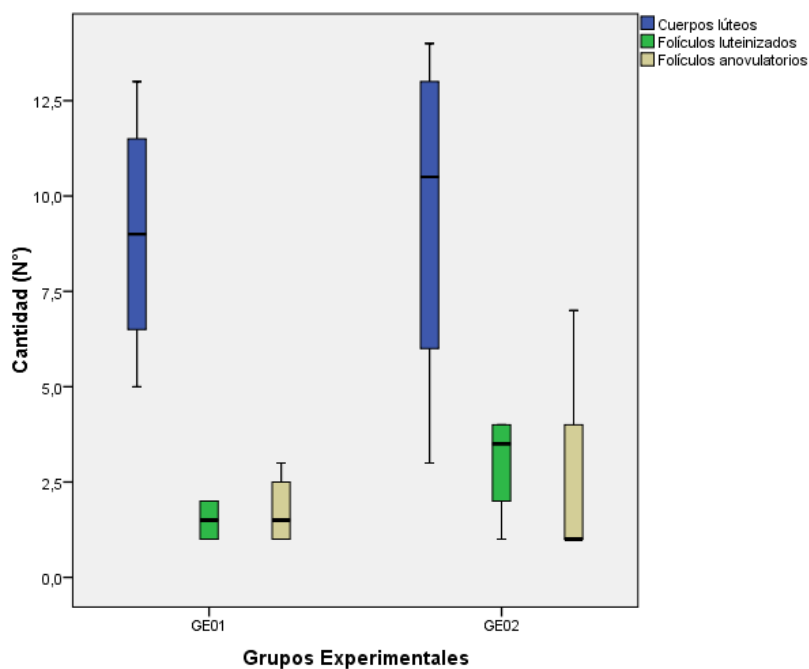


Figura 8A. Número de cuerpos lúteos, folículos anovulatorios luteinizados y folículos anovulatorios al día 14 del protocolo superestimulador con eCG en alpacas, según grupos experimentales